

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike - ja ympäristötieteiden laitos

EKT-sarja 1729

MANSIKKAHILLOJEN VÄÄRENNÖSTEN TUNNISTAMINEN
SPME-GC-MS- JA UHPLC-MS-TEKNIIKOILLA

Ilona Harmanen

Helsinki 2016



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author			
Ilona Harmanen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Mansikkahillojen väärennosten tunnistaminen SPME-GC-MS- ja UHPLC-MS-tekniikoilla			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Elintarvikekemia			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	
Maisterin tutkielma		Helmikuu 2016	
		Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
		130	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Elintarvikeväärennökset ovat jatkuvasti kasvava ongelma elintarvikkeiden oikeellisuuden ja laadun valvonnassa. Suomessa kasvipohjaisten elintarvikkeiden maahantuonnin valvonnasta vastaa Tullilaboratorio. Muun muassa kiristynyt taloustilanne ja taloudellisen voiton tavoittelu voivat houkuttaa väärennosten tekemiseen. Väärennös voi pahimmillaan aiheuttaa vakavan terveysriskin kuluttajalle. Kuluttajaa johdetaan myös harhaan, kun tuotteen pakkausmerkinnät eivät pidä paikkaansa. Etenkin marjahillot ja -soseet ovat helppo väärentämisen kohde, sillä hillon joukkoon voidaan huomaamattomasti ja helposti lisätä jotain toista halvempaa raaka-ainetta, jota ei aistinvaraisesti pysty erottamaan.</p> <p>Mansikka (<i>Fragaria x ananassa</i>) on ylivoimaisesti suosituin ja tuotetuin suomalainen marja. Lyhyen kasvukauden ja tuoresäilyvyysajan vuoksi mansikasta tehdään erilaisia hilloja, mehuja ja pakasteita niin kotiloissa kuin teollisesti. Mansikkatuotteita myös tuodaan Suomeen suuret määrät, jolloin joukossa saattaa olla joitain väärennettyjä tuotteita. Mansikka sisältää ravintoaineiden lisäksi satoja haihtuvia ja haihtumattomia yhdisteitä, jotka ovat seurausta kasvin kypsymisestä ja aineenvaihdunnasta. Kullekin kasvilajille tyypillisiä yhdisteitä kutsutaan myös merkkiyhdisteiksi.</p> <p>Tutkimuksen ensisijaisena tavoitteena oli selvittää miten tutkimukseen valitut tekniikat soveltuvat väärennosten tunnistamiseen määrittämällä hillojen aromi- ja fenolikoostumukset, sekä kehittää alustava kvalitatiivinen määrittämenetelmä Tullilaboratorion valvontakäyttöön hilloväärennosten havaitsemiseen. Mansikkahillon haihtuvien aromiyhdisteiden määrittämiseen valittiin kiinteäfaasimikrouutto (SPME) yhdistettynä kaasukromatografiaan (GC) ja massaspektrometriaan (MS) sekä haihtumattomien fenolisten yhdisteiden määrittämiseen erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC) yhdistettynä massaspektrometriaan. Fenoliset yhdisteet ultraäänitettiin ennen UHPLC-MS määrittystä. Väärentämiseen käytettyjä hedelmiä ja vihanneksia voivat olla esimerkiksi omena, päärynä ja kurpitsa, joten tutkimuksessa määritettiin kyseisillä menetelmillä lisäksi myös näiden kasvien merkkiyhdisteitä omena-, päärynä- ja kurpitsahilloista. Väärennosten havaitsemiskokeita varten tutkimuksessa tehtiin itse tehdystä mansikkahillosta (lajike Polka) väärennösseoksia, jotka sisälsivät 5–50 % omena- (lajike Ida Red), päärynä- (lajike Conference) tai kurpitsahilloa (lajike Butternut). Lisäksi tarkasteltiin menetelmien soveltuvuutta kaupallisten hillonäytteiden määrittämiseen. Tulosten tarkastelussa käytettiin toistettavuuskokeita ja pääkomponenttianalyysiä (PCA).</p> <p>SPME-GC-MS-menetelmän toistokokeiden suhteellinen keskihajonta (RSD) oli huomattavasti suurempi kuin UHPLC-MS-menetelmässä (51 % vs 10 %), mikä kertoi aromiyhdisteiden määrittämenetelmän huonosta toistettavuudesta. Kiinnostavana löytönä mansikkahillonäytteistä havaittiin pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteenä pidettyä floritsiinia sekä floretiini-ksyloglukosidia. Sekä aromi- että fenoliyhdisteiden koostumus oli erilainen ja toisistaan poikkeava itse tehdyissä mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloissa. Omenahillon ja kurpitsahillon aromiyhdisteiden koostumukset erosivat toisistaan eniten. Fenolisten yhdisteiden koostumusten eroissa mansikkahillon koostumus oli muista näytteistä poikkeavin. 5 %, 10 %, 20 % tai 50 % omenaa, päärynää tai kurpitsaa sisältäneet mansikkahilloväärennökset erottuivat itse tehdyistä yhden raaka-aineen hilloista sekä aromiyhdisteiden että fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella. Erot mansikkahillon ja väärennösseosten välillä olivat selkeät myös silloin kun vertailuhillona toiminut yhden raaka-aineen hillo (omena-, päärynä- tai kurpitsahillo) poistettiin PCA:sta. 5–20 % väärentävää ainesosaa sisältäneiden hillojen aromi- ja fenolikoostumuksen erot olivat pieniä, joten kvantitatiivisten erojen määrittäminen nykymuotoisella menetelmällä olisi haastavaa. 50 % väärentävää raaka-ainetta sisältäneet hillot erottuivat eniten muista väärennösseoksista kaikilla raaka-aineilla. Kaupallisten näytteiden aitouden arvioiminen todettiin tutkimuksessa haastavaksi mahdollisten vaihtelevuutta aiheuttavien tekijöiden johdosta.</p> <p>Molemmilla menetelmillä mansikkahilloväärennoksen havaitseminen todettiin kuitenkin mahdolliseksi tutkimuksessa käytetyillä lajikkeilla. Väärennös havaittiin mansikkahillosta jo silloin, kun väärentävää raaka-ainetta oli lisätty 5 %. Menetelmien jatkokehityksellä menetelmistä saadaan käyttökelpoisia Tullilaboratorion valvontakäyttöön.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Mansikka, omena, päärynä, kurpitsa, aromiyhdisteet, fenoliset yhdisteet, hillo, väärentäminen, elintarvikkeet			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda / Tullilaboratorio			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
EKT-sarja 1729			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Faculty of Agriculture and Forestry		Department of Food and Environmental Science	
Tekijä/Författare – Author			
Ilona Harmanen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Detection of Strawberry Jam Adulterations by SPME-GC-MS and UHPLC-MS			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Food Chemistry			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	
M. Sc. Thesis		February 2016	
		Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
		130	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Food adulteration is a constantly growing problem in the quality and safety control of food products. In Finland, the Finnish Customs Laboratory is responsible for the control of imported plant based foods. Among other things, challenging economic situation and gaining economic profit can tempt some people to make adulterated products. In a worse case adulteration can cause a serious health risk to the consumer. It's also misleading when the package doesn't contain truthful information. Particularly berry jams and purées are easy to adulterate since it's easy to replace the more expensive ingredient partly with cheaper material, which might be impossible to notice by the sensory characteristics.</p> <p>Strawberry (<i>Fragaria x ananassa</i>) is the most popular and produced berry in Finland. Because fresh strawberry has a short growing season and shelf life, a variety of jams, juices and frozen products are made at home and industrially. Large quantities of strawberry products are also imported into Finland, so there may be some fake products among them. Strawberry contains hundreds of volatile and non-volatile compounds, which are resulted of the plant maturation and metabolism. Some of these compounds are unique to each plant species and also known as marker compounds.</p> <p>The primary objective of this study was to examine the suitability of the selected research techniques for identifying adulterated jams by analyzing aroma and phenolic profiles of jams and to develop a preliminary qualitative control method for Customs Laboratory. Techniques used were solid-phase microextraction combined with gas chromatography and mass spectrometry (SPME-GC-MS) to analyse volatile aroma compounds and ultra-high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry (UHPLC-MS) for determination of phenolic compounds of self made strawberry jam. Phenolic compounds were extracted by ultrasound assisted extraction prior to UHPLC-MS analysis. Fruits and vegetables used in the jam fraud may be for example apple, pear and pumpkin, so the possible marker compounds were analysed also from jams made of these plants. Self-made fake jams were made by mixing strawberry jam (cultivar Polka) with apple (cv. Ida Red), pear (cv. Conference) and pumpkin (cv. Butternut) jams in proportions of 5–50 % to examine the detection of adulteration. Also some commercial products were analysed to evaluate the suitability of the methods to commercial samples. Results were analyzed and studied by repeatability tests of methods and principal component analysis (PCA).</p> <p>Relative standard deviation (RSD) of the SPME-GC-MS method was considerably higher than RSD of the UHPLC-MS method (51 % compared to 10 %) which tells about weak repeatability of the SPME-GC-MS method. Interesting discovery was the observation of phloridzin from the strawberry samples, since phloridzin has been used as a marker compound of apple although similar observation has been reported earlier. To our knowledge this is the first time phloretin xyloglucoside was also observed from strawberry samples. Self-made strawberry, apple, pear and pumpkin jams differed from each other on the basis of aroma and phenolic compounds composition of the studied cultivars. The aroma profile of apple jam and pumpkin jam differed from each other the most. By the phenolic profile strawberry jam was the most different from the other samples. The mixtures of strawberry jam with apple, pear and pumpkin jams in proportions of 5 %, 10 %, 20 % or 50 % were clearly separated from the self made pure jams on the basis of both aroma composition and phenolic composition. The differences between strawberry jam and fake jams were clear even when the reference jam (apple, pear or pumpkin jam) was removed from the PCA. The 5–20 % fake jam mixtures had only minor differences in aroma and phenolic composition, meaning that determination of quantitative differences with the current methods would be challenging. Mixtures of 50 % stood out the most from other fake mixtures. The evaluation of commercial samples was found to be challenging due to the variability factors of the study.</p> <p>Nevertheless both methods were found to be useful for the detection of adulterated strawberry jams made of selected cultivars. The detection of addition of apple, pear or pumpkin jam was already seen at the addition level of 5 %. With some modification and further development both of these methods can be used as quality control methods at Customs Laboratory.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Strawberry, apple, pear, pumpkin, aroma compounds, phenolic compounds, jam, adulteration, food			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
The Digital Respository of University of Helsinki, Helda / Finnish Customs Laboratory			
Muuta tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
EKT Series 1729			

ESIPUHE

Tämä maisterin tutkielma tehtiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella elintarvikekemian osastolla vuosien 2014–2016 aikana. Aihe oli toimeksianto Tullilaboratoriolta. Kokeellinen osio toteutettiin Tullilaboratorion tiloissa keväällä 2015. Tutkimusprojekti sai alkunsa vuosi ja viisi kuukautta sitten, ja siitä lähti matkani hilloväärennösten pariin. Työn vastuuprofessorina toimi elintarvikekemian professori Vieno Piironen. Työn ohjaajina toimivat elintarvikekemian dosentti Velimatti Ollilainen ja tullikemisti Pekka Ravio.

Haluan kiittää Tullilaboratoriota mielenkiintoisesta aiheesta sekä mahdollisuudesta työskennellä laboratoriossanne. Lämpimät kiitokset kuuluvat koko PES-jaoston väelle, jotka ottivat minut mukaan osaksi työyhteisöä jo harjoitteluni aikana. Kiitokset jaoston laboranteille arvokkaista vinkeistä käytännön töissä sekä hauskoista hetkistä töiden parissa. Haluan kiittää myös jaoston entistä päällikköä Kalevi Siivistä, joka aikoinaan otti minut Tullilaboratorioon harjoitteluun ja avasi mahdollisuuden myös tähän maisterin tutkielmaan.

Haluan sydämeni pohjasta kiittää tutkielmani ohjaajia Velimattia ja Pekkaa arvokkaista neuvoistanne ja avustanne tämän matkan varrella. Kiitos kärsivällisestä ohjauksesta tutkielman eri vaiheissa ja tuesta silloin, kun itse meinasin lannistua haasteiden edessä. Lämpimät kiitokset myös dosentti Anna-Maija Lammelle sekä professori Vieno Piroselle arvokkaista kommentteista tutkielman loppuvaiheessa.

Kiitoksia gradukollegoilleni vertaistuesta. Teidän kanssa on ollut ilo jakaa kokemuksia. Erityiskiitos opponenttinani toimineelle Jussi Jaatiselle, oli hauskaa tehdä yhteistyötä elintarvikeväärennösten parissa.

Kiitos myös Helsingin yliopiston Maatalous-metsätieteiden rahastolle taloudellisesta tuesta maisterin tutkielman toteuttamiseen.

Lopuksi haluan kiittää rakkaita ystäviäni, poikaystävääni sekä perhettä kaikesta siitä henkisestä ja taloudellisesta tuesta mitä olette tämän projektini hyväksi antaneet. Olette korvaamattomia.

Viikissä 19.2.2016

Ilona Harmanen

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

KÄYTETYT LYHENTEET

1	JOHDANTO	8
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	11
2.1	KASVIPOHJAISET ELINTARVIKEVÄÄRENNÖKSET	11
2.2	HILLOISTA YLEISESTI	12
2.3	HILLOVÄÄRENNÖSRAAKA-AINEIDEN MERKKIYHDISTEET	14
2.3.1	Omena	15
2.3.2	Päärynä	18
2.3.3	Kurpitsa	20
2.4	MANSIKKA	21
2.4.1	Mansikan aromiyhdisteet	22
2.4.2	Mansikan fenoliset yhdisteet	24
2.5	MERKKIYHDISTEISIIN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT	28
2.5.1	Aromiyhdisteisiin vaikuttavat tekijät	28
2.5.2	Fenolisiin yhdisteisiin vaikuttavat tekijät	28
2.6	HILLOVÄÄRENNÖSTEN ANALYTIikka	30
2.6.1	Aromiyhdisteiden analysointi	31
2.6.2	Fenolisten yhdisteiden analysointi	34
2.6.3	Metabolomiikkatutkimukset	39
2.6.4	Tilastolliset monimuuttujamenetelmät	40
2.7	YHTEENVETO	42
3	KOKEELLINEN TUTKIMUS	44
3.1	TYÖN TAUSTA JA TAVOITE	44
3.2	MATERIAALIT	45
3.2.1	Näytteet	45
3.2.2	Reagenssit ja muut raaka-aineet	46
3.2.3	Laitteet ja välineet	47
3.3	MENETELMÄT	48
3.3.1	Näytteiden esikäsittely ja hillojen valmistus	48
3.3.2	SPME-GC-MS	49
3.3.2.1	SPME-esikokeet ja aromiyhdisteiden uutto	49
3.3.2.2	GC-MS-esikokeet ja aromiyhdisteiden määrittäminen	50
3.3.2.3	Tulosten käsittely	51
3.3.3	UHPLC-MS	52
3.3.3.1	Uuttomenetelmien esikokeet ja valinta	53
3.3.3.2	UHPLC-MS-esikokeet ja fenolisten yhdisteiden määrittäminen	54
3.3.3.3	Tulosten käsittely	56
3.3.3.4	Floritsiinin määrityksen varmistus	57
3.3.4	Tulosten tilastollinen käsittely	57
3.3.5	Menetelmien toistettavuus ja saantokoe	58
3.4	TULOKSET	59
3.4.1	Aromiyhdisteet	59
3.4.2	Fenoliset yhdisteet	61
3.4.2.1	Floritsiinin havaitseminen näytteistä	61
3.4.2.2	Arbutiinin havaitseminen näytteistä	62
3.4.2.3	Muita fenolisia yhdisteitä	62
3.4.3	Menetelmien toistettavuus	63
3.4.3.1	Aromiyhdisteiden määritysmenetelmän toistettavuus	63
3.4.3.2	Fenolisten yhdisteiden määritysmenetelmän toistettavuus	65

3.4.4	Mansikkahillon ja -soseen vertailu	67
3.4.4.1	Aromikoostumuksen erot	67
3.4.4.2	Fenolikoostumuksen erot	68
3.4.5	Itse tehtyjen hillojen vertailu	69
3.4.5.1	Aromikoostumuksen erot	69
3.4.5.2	Fenolikoostumuksen erot	70
3.4.6	Väärentämisen havaitseminen hillon aromiyhdisteiden perusteella	71
3.4.6.1	Mansikka- ja omenahillo sekä niiden seokset	71
3.4.6.2	Mansikka- ja päärynähillo sekä niiden seokset	72
3.4.6.3	Mansikka- ja kurpitsahillo sekä niiden seokset	74
3.4.7	Väärentämisen havaitseminen hillon fenolisten yhdisteiden perusteella	75
3.4.7.1	Mansikka- ja omenahillo sekä niiden seokset	75
3.4.7.2	Mansikka- ja päärynähillo sekä niiden seokset	76
3.4.7.3	Mansikka- ja kurpitsahillo sekä niiden seokset	77
3.4.8	Kaupallisten hillotuotteiden tarkastelu	78
3.4.8.1	Aromikoostumuksen erot	78
3.4.8.2	Fenolikoostumuksen erot	81
3.4.9	Yhteenvedo tuloksista	83
3.5	POHDINTA	84
3.5.1	Näytevalinnat	84
3.5.2	Menetelmät	85
3.5.2.1	SPME-GC-MS-menetelmän esikokeet	85
3.5.2.2	UHPLC-MS-menetelmän esikokeet	87
3.5.2.3	Menetelmien toistettavuuden arviointi	88
3.5.3	Havaitut aromi- ja fenoliyhdisteet	90
3.5.4	Aromikoostumuksen PCA-tulokset	91
3.5.5	Fenolikoostumuksen PCA-tulokset	95
4	PÄÄTELMÄT	97
	LÄHDELUETTELO	100
	LIITTEET	
Liite 1	Omenalajikkeiden aromiyhdisteitä	
Liite 2	Omenalajikkeiden fenolisia yhdisteitä	
Liite 3	Päärynälajikkeiden aromiyhdisteitä	
Liite 4	Päärynälajikkeiden fenolisia yhdisteitä	
Liite 5	Kurpitsalajikkeiden aromi- ja fenoliyhdisteitä	
Liite 6	Mansikkalajikkeiden aromiyhdisteitä	
Liite 7	Mansikan aromiyhdisteiden rakenteita	
Liite 8	Mansikkalajikkeiden fenolisia yhdisteitä	
Liite 9	Mansikan ellagitanniinien rakenteita	
Liite 10	Fenolisten yhdisteiden jaottelu pääryhmiin	
Liite 11	Tutkimuksen kaupalliset näytteet	
Liite 12	Havaittuja mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan aromiyhdisteitä	
Liite 13	Havaittuja mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan fenolisia yhdisteitä	
Liite 14	Floritsiinin malliaineen massaspektri	
Liite 15	Polka-mansikkalajikkeesta tehdyn soseen massaspektri floritsiinin havaitsemisesta	

KÄYTETYT LYHENTEET

SPME	kiinteäfaasimikrouutto
GC	kaasukromatografia
UHPLC	erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia
HPLC	suuren erotuskyvyn nestekromatografia
MS	massaspektrometria
DAD	diodirivi-ilmaisin
PDMS	polydimetyylisiloksaani
EU	Euroopan unioni
PDMS-DVB	polydimetyylisiloksaani-divinylibentseeni
PDMS-CAR-DVB	polydimetyylisiloksaani-karbokseeni-divinylibentseeni
HCOOH	muurahaishappo
TFA	trifluorietikkahappo
UV/VIS	ultravioletti/näkyvä valo
ESI	sähkösumutusionisaatio
PCA	pääkomponenttianalyysi
PC1, PC2	ensimmäinen pääkomponentti, toinen pääkomponentti
CAR-PDMS	karbokseeni-polydimetyylisiloksaani
LTQ-Orbitrap	ioniloukku-orbiloukku
TIC	kokonaisionivirta
RT	retentioaika
N	havaintotapaus pääkomponenttianalyysissä (rinnakkaiset näytteet)
K	muuttuja pääkomponenttianalyysissä (havaitut yhdisteet)
RSD	suhteellinen keskihajonta
HILIC	hydrofiilinen vuorovaikutusnestekromatografia
RPLC	käänteisfaasinestekromatografia
ISTD	sisäinen standardiyhdiste

1 JOHDANTO

Elintarvikeketjun arvokkain osa on tuotteen raaka-aine, mistä johtuen elintarvikeväärennökset ovat jatkuva ongelma elintarvikkeiden oikeellisuuden valvonnassa (Fügel ym. 2005; Primrose ym. 2010; Van Leeuwen ym. 2014). Myös Europolin mukaan väärennösten määrä on jatkuvassa kasvussa (Europol 2015). Elintarvikkeita väärennettiin kuitenkin jo Rooman antiikin aikaan. Väärennettäviä tuotemahdollisuuksia on lähes kaikissa elintarvikeryhmissä, koska tuotteiden väärentämistapoja on myös useita. Yleisimpiä väärennösten kohde-elintarvikkeita ovat kasviöljyt, maito, hunaja, sahrami, viinit ja tee, mutta monenlaisia kasvipohjaisia ja eläinperäisiä tuotteita voidaan väärentää (Moore ym. 2012).

Termille ”elintarvikeväärennös” (engl. food fraud) ei ole vielä virallista määritelmää Euroopan unionin lainsäädännössä, mutta elintarvikeväärentämisellä tarkoitetaan hyödyntämistarkoituksessa tapahtuvaa tahallista erehdyttämistä, jonka taustalla on käytännössä aina taloudelliset motiivit (engl. economically motivated adulteration), pieni kiinnijäämisriski ja lievät rangaistukset. Muun muassa kiristynyt taloustilanne voi houkutella väärennösten tekemiseen, mikä vääristää kilpailua muiden tuottajien osalta. Tieto elintarvikkeen sisällöstä perustuu toimijoiden hallussa oleviin dokumentteihin ja pakkaustietoihin. Elintarvikkeen tuotantoketjussa voi olla yli 15 solmukohtaa ennen tuotteen päätymistä kuluttajalle, ja jäljitys taaksepäin perustuu dokumentteihin. Jäljittäminen on työlästä ja vaatii resursseja. Toiminta perustuukin pääasiassa siihen, että yhteistyökumppanien toimitussopimukset ja dokumentit ovat luotettavia. Väärentäjät vahingoittavat toimillaan tuotteen tilaajaa ja väärennetyn tuotteen tavaramerkkiä. Kun tuotteen pakkausmerkinnät eivät pidä paikkaansa, ennen kaikkea kuluttajaa johdetaan harhaan. Keskittyessään vain taloudelliseen hyötyyn ja laadunvalvontajärjestelmien ohittamiseen väärentäjillä ei oletettavasti ole sen enempää kiinnostusta kuin resursseja ja tietämystä toimenpiteidensä riittävään riskinarviointiin, joten terveydellistä haittaa aiheuttavan väärentävän yhdisteen vaikutukset tiedetään yleensä vasta silloin kun on jo myöhäistä. Koko elintarvikeketjun turvallisuus voi kaatua kriminaalisiin toimiin ja pahimmillaan väärennös voi aiheuttaa terveysriskin kuluttajalle, jos tuotteen joukossa on esimerkiksi jotain allergisoivaa tai kasvulle ja kehitykselle haitallista yhdistettä.

Euroopan unionissa ei myöskään ole vielä tarkempia tilastoja elintarvikepetosten määristä, sillä komissio yksilöi elintarvikepetokset uudeksi toimenpidealaksi vasta viime vuosina (Euroopan komissio 2013). Koko alan kokonaisrikoshyödystä ja -vahingoista ei siten voida nykytiedoilla tehdä luotettavia arvioita, koska suurin osa väärennöstuotteista ei vielä jää

kiinni. Joitain suuntaa-antavia arvioita on kuitenkin tehty arvioiden tekemisen haasteellisuudesta huolimatta. Vuonna 2010 elintarvikeväärennösten on arvioitu maksavan vuosittain maailmanlaajuisesti noin 14 miljardia euroa (Grocery Manufactures Association 2010). Uudemmat arviot maailmanlaajuisista kustannuksista ovat oletettavasti moninkertaisesti suurempia, sillä myöhemmin on arvioitu, että elintarvikemarkkinoilla liikkuisi pelkästään jo italialaisiksi väitettyjä väärennöstuotteita noin 60 miljardin euron arvosta (Mueller 2012). Interpolin ja Europolin lähivuosina toteutetussa operaatiossa takavarikoitiin 2500 tonnia väärennettyjä tuotteita (Europol 2015). Mukana oli muun muassa mozzarella-juustoa, mansikoita, kananmunia, paistoöljyä ja kuivattuja hedelmiä. Euroopan unionissa on aloitettu myös systemaattinen tiedon kerääminen elintarvikkeiden väärennöksistä (Euroopan komissio 2013). Vuonna 2015 Euroopan unionin jäsenmaiden Rapid Alert System for Food and Feed -raportointijärjestelmään oli tehty 91 kappaletta tiedoksiantoja elintarvikkeita koskevista väärennöksistä (Euroopan komissio 2016). Vuonna 2014 vastaavia ilmoituksia tai huomautuksia oli tehty 88 kpl ja vuonna 2013 158 kpl.

Väärentämisen monet muodot ovat haaste elintarvikeväärennösten analytiikalle, sillä väärennöstä ei yleensä havaita aistinvaraisesti. USP's Food Fraud -tietokannan tutkimuksista 95 % käsitteli korvaamiskategoriaa, joten myös väärennösten analytiikassa on keskitytty tähän väärennösmuotoon (Moore ym. 2012; USP's Food Fraud Database 2015). Väärennösten tunnistaminen ja elintarvikeväärennösten analytiikka perustuu yleensä tiettyjen raaka-ainekohtaisten merkkiyhdisteiden havaitsemiseen tai puuttumiseen tuotteesta. Vaikka elintarvikeväärennöksiä on tutkittu runsaasti ja uusia tutkimuksia on parhaillaan käynnissä, on työtä edelleen jäljellä, ja monenlaisen tuotteen aitouden testaamiseen ei ole vielä kehitetty menetelmiä. Helsingin yliopiston elintarvikekemian osastolla elintarvikkeiden aineosien väärentämisestä koskeva edellisin maisterin tutkielma on vuodelta 2010. Malmbergin (2010) tutkimuksessa metsämustikan (*Vaccinium myrtillus* L.) antosyaaniprofiilia verrattiin saskatoonin (*Amelanchier alnifolia* Nutt.), variksenmarjan (*Empetrum nigrum*), aronian (*Aronia melanocarpa*) ja pensasmustikan (*Vaccinium corymbosum*) antosyaaniprofiileihin ja etsittiin mahdollisia väärentämistä osoittavia eroja. Tutkimuksessa todettiin, että fenolisten yhdisteiden koostumuksen analyysi soveltui antosyaaneja sisältävien marjatuotteiden aitouden osoittamiseen. 25 % muuta marjaa pystyttiin havaitsemaan metsämustikkasoseen seasta erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia-diodirivi-ilmaisoin (UHPLC-DAD) -menetelmällä. Elintarvikekemian osastolla on tehty myös kandidaatin tutkielma hillojen ja marjasoseiden väärennösten

tunnistamisesta (Vironen 2014). Tullilaboratorion toimeksiannosta tehdyssä kirjallisuuskatsauksessa tarkasteltiin erilaisia tekniikoita hilloväärennosten osoittamiseen.

Myös tämä maisterin tutkielma tehtiin Tullilaboratoriolle. Tullilaboratorio on valtiovarainministeriön hallinnonalaan kuuluvan tullilaitoksen asiantuntijayksikkö, jonka toimialueena on koko Suomi (Tulli 2015). Tullilaboratorio vastaa Tullin lakisääteisiin tehtäviin sisältyvistä kulutustavaroiden ja muiden kuin eläinperäisten elintarvikkeiden tuontivalvonnasta Euroopan unionin valvonta-asetuksen mukaisesti (vertailulaboratorion toiminta EY N:o 882/2004). Tullilaboratorion tutkimusten perusteella määräystenvastaisten ja vaarallisten tuontierien pääsy kuluttajille estyy päivittäin. Elintarvikkeiden väärentämistä koskeva tutkimus on ollut Tullilaboratoriossa vireillä jo jonkin aikaa, ja tutkimusta haluttiin nyt laajentaa käytännön tasolle. Tämän tutkimuksen kohteeksi valittiin mansikkahillot ja -soseet, koska mansikka (*Fragaria x ananassa*) on ylivoimaisesti suosituin ja tuotetuin suomalainen marja. Suomeen tuodaan suuret määrät mansikkatuotteita, jolloin joukossa saattaa olla joitain väärennettyjä tuotteita. Mansikan suurimpia tuottajamaita ovat muun muassa Kiina, Espanja, Yhdysvallat ja Puola, joissa on myös hilloteollisuutta (FAOSTAT 2015). Tutkimuksen kohdennus tässä vaiheessa pelkästään mansikkahilloihin oli perusteltua.

Tutkielman kirjallisuuskatsauksessa tarkasteltiin kasvipohjaisten elintarvikkeiden väärentämistä, hilloja yleisesti sekä hilloväärennöksissä mahdollisesti käytettävien raaka-aineiden tyypillisiä merkkiyhdisteitä. Tämän jälkeen tarkasteltiin tutkimuksen kohteena olevaa mansikkaa ja hilloväärennosten analytiikkaa.

Tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää miten tutkimukseen valitut tekniikat soveltuivat mansikkahilloväärennosten tunnistamiseen. Tekniikat olivat kiinteäfaasimikrouutto yhdistettynä kaasukromatografiaan ja massaspektrometriin (SPME-GC-MS) sekä UHPLC yhdistettynä massaspektrometriin (UHPLC-MS). Tavoitteena oli mahdollisuuksien mukaan kehittää alustava kvalitatiivinen määritysmenetelmä Tullilaboratorion valvontakäyttöön mansikkatuotteiden väärennosten tunnistamiseen. Työssä tutkittiin kuinka hyvin väärentävä raaka-aine pystyttiin havaitsemaan mansikkahillon joukosta SPME-GC-MS- ja UHPLC-MS-tekniikoita käyttäen. Tekniikoilla määritettiin muun muassa mansikalle ominaisia ja tyypillisiä aromiyhdisteitä ja fenolisia yhdisteitä. Väärennosten havaitsemiskokeita varten tutkimuksessa tehtiin itse mansikkahilloväärennöksiä. Lisäksi testattiin menetelmien soveltuvuutta kaupallisten hillonäytteiden aitouden määrittämiseen. Tulosten tarkastelussa käytettiin toistettavuuskokeita ja pääkomponenttianalyysia.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 KASVIPOHJAISET ELINTARVIKEVÄÄRENNÖKSET

Kaikenlaisille elintarviketuotteille on tietyt laatukriteerit, omat määritelmät ja tuotteita koskevat säädökset Euroopan unionin lainsäädännössä. Näistä säädöksistä poikettaessa on kyse väärentämisestä. Väärentämisen kohteena olevia kasvipohjaisia tuotteita voivat olla lähes kaikenlaiset vihanneksista, marjoista ja hedelmistä tehdyt valmisteet: esimerkiksi mehut, viinit, tee, alkoholi ja muut juomat sekä hillot, vihannesvalmisteet, säilykkeet, mausteet ja kuivatut hedelmät. Kasviöljyjen väärentämistä ei käsitellä tässä tutkimuksessa, sillä niistä on valmistumassa toinen tutkimus (Jaatinen 2016). Marjahillot, -soseet ja -mehut ovat helppo väärentämisen kohde, sillä pääraaka-aine on jo tuotteen valmistuksessa muuttunut ja siten vaikeammin tunnistettavissa (Reid ym. 2004; Fügél ym. 2005).

Väärentämistapoja on myös useita. Kasvitieteellisessä väärentämisessä tuotteen pääraaka-ainetta korvataan jollain halvemmalla raaka-aineella, joka muistuttaa aistinvaraiselta laadultaan (haju, maku, koostumus ja väri) läheisesti alkuperäistä raaka-ainetta tai on muuten koostumukseltaan hyvin väritön ja mauton. Väärentämistä on myös raaka-aineen lisäys tai poisto kokonaan, mutta nämä käytännöt ovat huomattavasti harvinaisempia. Mooren ym. työryhmä kokosi vuonna 2012 kattavan tietokannan elintarvikeväärennöksiä koskevista tutkimuksista (USP's Food Fraud Database 2015). Tietokannan tutkimuksista 95 % käsiteli korvaamiskategoriaa, alle 5 % lisäyskategoriaa ja alle 1 % poistokategoriaa (Moore ym. 2012).

Korvaamisessa voidaan käyttää täysin eri kasvia. Esimerkiksi hillon tai soseen joukkoon voidaan huomaamattomasti ja helposti lisätä jotain toista halvempaa raaka-ainetta, kuten omenaa mansikkahillon sekaan, päärynää kvittenihillon sekaan tai kurpitsaa aprikoosihillon sekaan (Silva ym. 2000; Reid ym. 2004; Dragovic-Uzelac ym. 2005). Korvaaminen voidaan tehdä myös saman kasvin eri lajikkeella, joka muistuttaa alkuperäistä raaka-ainetta vielä enemmän kuin eri kasvit, esimerkiksi metsämustikkaa (*Vaccinium myrtillus*) voitaisiin korvata pensasmustikalla (*Vaccinium corymbosum*) (Malmberg 2010). Tuotteesta riippuen korvatun osan suuruus voi olla vaihteleva, mutta epäilemättä korvaamisella pyritään saavuttamaan maksimaalinen taloudellinen hyöty. Raaka-aineen siirtyessä tuotantoketjun vaiheesta toiseen joukkoon saattaa sekoittua myös lisää aitoa materiaalia, joten väärennöksen määrä voi pienentyä hankalasti havaittavaksi määräksi.

Myös tuotteen laimentaminen esimerkiksi vedellä, sokerilla, pektiinillä, hedelmälihalla tai muunlaisella täytemateriaalilla on yleistä väärennettävästä tuotetypistä riippuen. Vuosina 2013–2014 yleisimmin tehdyt Rapid Alert System for Food and Feed -ilmoitukset elintarvikeväärennöksistä koskivat pääraaka-aineen määrää, joka ei vastannut pakkauksen informaatiota. Esimerkiksi hillon liukoisen kiinteän aineen määrä saattoi olla vain noin 21 %, kun pakkauksen mukaan olisi pitänyt olla 45 %, eli kyse oli laimennetusta tuotteesta (Euroopan komissio 2014).

Teknologisesta väärentämisestä on kyse silloin, kun tuotteeseen on lisätty jokin lisäaine parantamaan esimerkiksi tuotteen väriä, aromia, makua tai muuta ominaisuutta ilman, että sitä on mainittu pakkausselosteessa. Lisäaine voi olla joko luonnollista tai synteettistä alkuperää. Esimerkiksi punajuuren, kirsikan ja viinirypäleiden punaiset väriyhdisteet (antosyaanit, betalaiinit ym.) ovat hyvin voimakkaan värisiä ja yleisesti väriaineena käytettyjä, mutta niitä ei lasketa tuotteen hedelmä- tai marjapitoisuuteen kuuluvaksi vaan lisäaineeksi, jolloin niiden käytöstä tuotteessa tulee mainita. Teknologista väärentämistä on myös kaikenlaisten säädösten vastaisten käsittelyjen tai prosessivaiheiden käyttäminen tuotteelle.

Kasvipohjaisia tuotteita, kuten kahvia, viiniä, samppanjaa ja marjatuotteita, voidaan väärentää myös maantieteellisesti. Maantieteellisestä väärentämisestä on kyse, kun jonkin tuotteen väitetään valheellisin perustein olevan peräisin tietyltä maantieteelliseltä ja mahdollisesti nimikesuojatulta alueelta. Tuotteen alkuperämerkintä auttaa jäljitettävyydessä mutta ei torju elintarvikerikollisuutta. Euroopan unionin merkinnät PDO (Protected Designation of Origin), PGI (Protected Geographical Indication) ja TSG (Traditional Speciality Guaranteed) takaavat kuitenkin tuotteen olevan varmistetusti aito ja tietyllä menetelmällä valmistettu (Euroopan komissio 2015). Väärentämistavat voivat mennä myös keskenään ristiin. Esimerkiksi keskieuropalaisen pensasmustikan käyttö pohjoismaisen metsämustikan seassa tai korvikkeena olisi sekä kasvitieteellistä että maantieteellistä väärentämistä.

2.2 HILLOISTA YLEISESTI

”Hillo” on Euroopan unionin neuvoston direktiivin mukaan sopivan hyytelömäiseksi tehty seos, jossa on sokereita, yhden tai useamman hedelmälajin hedelmälihaa ja/tai sosetta sekä vettä (EU Neuvoston direktiivi 2001/113/EY). 1000 grammaan valmista tuotetta on pääsääntöisesti käytettävä vähintään 350 grammaa hedelmälihaa ja/tai sosetta.

”Erikoishillossa” puolestaan voidaan käyttää sokerin lisäksi yhden tai useamman hedelmälajin tiivistämätöntä hedelmälihaa ja vettä. Erikoishillossa hedelmälihaa on oltava pääsääntöisesti vähintään 450 grammaa 1000 grammaa kohti. Jos hilloissa käytetään useampaa hedelmää tai marjaa keskenään, eri hedelmälajeille vahvistettuja vähimmäispitoisuuksia on vähennettävä suhteessa käytettyihin prosenttiosuuksiin. Hillon liukenevan kuiva-aineen pitoisuuden on refraktometrillä määritettynä oltava vähintään 60 % lukuun ottamatta tuotteita, joissa sokerit on korvattu osittain tai kokonaan makeutusaineilla. Hedelmähilloja, hyytelöitä ja marmeladeja koskevan aiemmin annetun Euroopan unionin direktiivin 1979/693/ETY antamista oli perusteltu sillä, että hedelmävalmisteita koskevien kansallisten lainsäädäntöjen erot saattoivat luoda vilpillisiä kilpailuolosuhteita, jotka johtaisivat todennäköisesti kuluttajia harhaan ja näin vaikuttaisivat suoraan yhteismarkkinoiden toteuttamiseen ja toimintaan. Direktiivin 1979/693/ETY ja 2001/113/EY tavoitteena oli sen vuoksi vahvistaa määritelmät ja yhteiset säännöt hedelmävalmisteiden koostumuksesta, valmistustiedoista ja merkinnöistä niiden vapaan liikkuvuuden varmistamiseksi yhteisössä.

Hillon valmistus vaikuttaa merkittävästi hillon pääraaka-aineen koostumukseen. Jo pelkästään sokerin lisäys hilloon tai soseeseen laimentaa raaka-aineen ravintoaineiden ja muiden yhdisteiden pitoisuuksia. Teollinen hillo sisältää keskimäärin noin puolet sokeria (50 g/100 g). Suuri osa ravintoaineista menetetään prosessoinnin aikana myös mekaanisista työvaiheista johtuen. Raaka-aineen alkuperäinen fysikaalinen muoto hajoaa erilaisissa prosessointivaiheissa ja tietyn hedelmän tunnistaminen voi olla hankalaa tuotteen tällaisessa muodossa. Tästä syystä marjahillot ja -soseet ovat helppo väärentämisen kohde (Reid ym. 2004; Fügél ym. 2005). Hillon tai soseen joukkoon voidaan varsin huomaamattomasti ja helposti lisätä jotain toista halvempaa raaka-ainetta, jota ei aistinvaraisesti pystytä erottamaan.

Homogoinnissa, murskauksessa ja sekoituksessa pääraaka-aineen erilaiset yhdisteet voivat hajota pienemmiksi yhdisteiksi, yhdisteiden osiksi tai muuntua toisiksi yhdisteiksi. Esimerkiksi tiettyjä kvittenihillon ominaiseen ja voimakkaaseen makuun vaikuttavia yhdisteitä ei esiinny tuoreessa hedelmässä, mutta ne muodostuvat prosessoinnin aikana (Güldner ja Winterhalter 1991). Keittäminen, pastörinti, pullotus, pakkaaminen, varastointi ja muut prosessointivaiheet vaikuttavat myös tuoreen kasvoksen ja siitä valmistetun tuotteen aromikoostumusten eroihin (Elss ym 2006). Prosessoinnin lisäksi yhdisteiden pitoisuustasoon voi merkittävästi vaikuttaa myös hedelmän lajike sekä kypsyyssaste. Monet yhdisteet voivat sijaita myös raaka-aineen kuoressa, mikä saatetaan

poistaa hedelmän elintarvikekäyttöä varten (esim. omenan kuori). Joitakin antosyaaneja, kuten syanidiini-3-galaktosidia, havaittiin eräässä tutkimuksessa vain punaisten omenoiden kuoreissa (esimerkiksi lajikkeet Red Delicious ja Ida Red) (Tsao ym. 2003). Fenolisten yhdisteiden kvalitatiivinen profiili saattaa silti säilyä hillon valmistuksessa melko muuttumattomana hedelmästä tai marjasta riippuen, sillä samanlaisia fenoliprofiileja on havaittu tietyistä hedelmistä valmistetusta hillosta kuin tuoreista hedelmistä (Tomás-Lorente ym. 1992).

Soseen ja hillon valmistuksessa myös hedelmän tai marjan värin intensiivisyys pienenee (Downey ym. 2004). Muutokset ovat vielä suurempia silloin, kun hedelmää käsitellään sulfiiteilla soseen valmistuksessa säilymisajan pidentämiseksi. Antosyaanit ovat yhdisteitä, jotka aiheuttavat hedelmän luonnollisen värin. Esimerkiksi vetysulfiitti sitoutuu voimakkaasti antosyaanien kromoforeihin, mikä pienentää merkittävästi marjasta tai hedelmästä tehdyn soseen värin intensiivisyyttä. Sulfiiteilla käsitellyn soseen, esimerkiksi mansikka- tai vadelmasoseen, väärentäminen on vielä helpommin mahdollista kuin käsittelemättömän soseen väärentäminen, sillä soseen väri muuttuu vaaleammaksi jo sulfiittien vaikutuksesta. Tällaisen väärentämisen uskotaan olevan yleistä.

Hilloja käytetään enimmäkseen sellaisenaan, mutta niitä tai esimerkiksi marmeladeja, mehuja ja hyödykkeitä voidaan käyttää myös raaka-aineena monenlaisissa tuotteissa, kuten jugurtit, jäätelöt, smoothiet ja maitopohjaiset tuotteet sekä erilaiset leivonnaiset ja konvehdit. Näille tuotteille on omat vaatimuksensa muun muassa hillojen määrien suhteen. Etenkin tällaisissa tuotteissa hillojen aitouden valvonta on vielä haastavampaa kuin pelkästään hillossa itsessään, sillä hillon määrä lopputuotteessa on yleensä pieni (vain muutamia grammoja tai vähemmän).

2.3 HILLOVÄÄRENNÖSRAAKA-AINEIDEN MERKKIYHDISTEET

Hedelmät ja marjat ovat mehujen, nektariinien ja hillojen kalleimpia raaka-aineita, mikä voi houkutella valmisteiden tekijää korvaamaan osan pääraaka-aineesta halvemmalla ainesosalla. Hilloväärennösten kiinnisaamiseksi on etsitty erilaisia keinoja tunnistaa väärennetty hedelmä- tai marjatuote aidosta tuotteesta. Keinoina on käytetty esimerkiksi erilaisten haihtuvien ja haihtumattomien merkkiyhdisteiden etsimistä erilaisista kasviksista. Väärennöksen havaitsemiseksi on oleellista tietää, mistä mahdollinen väärentävä raaka-aine koostuu ja millaisia mahdollisia merkkiyhdisteitä se sisältää. Hillojen väärentämiseen käytettyjä hedelmiä ja vihanneksia voivat olla esimerkiksi omena, päärynä ja kurpitsa.

Määritettäessä omenan haihtuvia yhdisteitä SPME:lla 100 µm:n polydimetyylisiloksaani (PDMS) -kuitua käyttäen hallitsevimmat haihtuvat yhdisteet olivat intensiteetin perusteella laskevassa järjestyksessä α-farneseeni, heksyyli-2-metyylibutanoaatti, heksyyli-heksanoaatti, heksyylibutanoaatti, butyyliheksanoaatti, heksyyliasetaatti ja 2-metyyli-butyyliasetaatti (Song ym. 1997). Purge-and-trap -systeemeihin verrattuna SPME:n intensiteetti suureni sitä mukaa mitä isokokoisempi, poolittomampi ja hydrofobisempi yhdiste oli. Tästä johtuen α-farneseenin intensiteetti oli suurin.

Aromikoostumuksessa voi olla eroa myös eri omenalajikkeiden välillä (Aprea ym. 2011). Golden Delicious -omenalajikkeelle tyypillisiä yhdisteitä olivat esimerkiksi propyyli-2-metyyli-2-butanoaatti, isobutyryli-2-metyyli-2-butanoaatti ja 3-metyyli-1-pentanol, kun Pinova-omenille tyypillisiä yhdisteitä olivat 2-etyylifenoli ja heksyryli-2-metyyli-2-butanoaatti. Etyyli-2-butanoaatti, 5-heksenyliasetaatit ja butyryliheksanoaatti olivat sen sijaan tyypillisiä yhdisteitä Stark Delicious -omenille ja Granny Smith -omenalajikkeelle tyypilliseksi mahdolliseksi merkkiyhdisteeksi Aprean ym. (2011) työryhmän tutkimuksessa tunnistettiin N-fenyylianiliini, jota kutsutaan myös difenyyliamiiniksi. N-fenyylianiliinia käytetään sekä ennen sadonkorjuuta että korjuun jälkeen tapahtuvan omenan pilaantumisen (engl. apple scalding) estämiseen. N-fenyylianiliini toimii antioksidanttina suojaten omenan kuorta mm. α-farneseenin hapettumistuotteilta varastoinnin aikana (Mir ja Beaudry 1999).

Omenan aromista on tunnistettu myös joitakin virhearomeja aiheuttavia yhdisteitä, kuten α -terpineoli ja karvoni, joista jälkimmäinen on limoneenin johdannainen (Popken ym. 1999; Elss ym. 2007). Myös jotkin bakteerilajit, kuten *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Actinomyces* sekä niiden alalajit voivat tuottaa aromiaktiivisia yhdisteitä, kuten dibromofenolia, geosmiinia ja 2-metyyli-isoborneolia, jotka voivat aiheuttaa tyypillisiä virhemakuja muun muassa omenamehuun (Zierler ym. 2004).

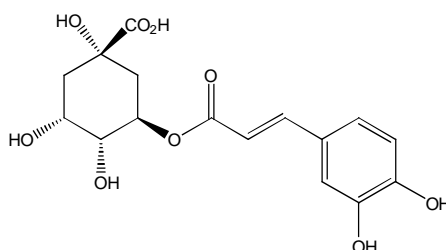
Omenan fenoliset yhdisteet

Eri omenalajikkeiden fenolisten yhdisteiden koostumuksissa ja pitoisuustasoissa on havaittu merkittäviä eroja. Kevers ym. (2011) tutkivat 14 erilaisen omenalajikeen fenolisia yhdisteitä (Belgica, Boskoop, Braeburn Hitweel, Braeburn Mariri Red, Delbard Estival, Elstar, Gala, Golden, Greenstar, Jonagold Red, King Jonagold, Pinova, Santana ja Topaz). Lajikkeiden kokonaisfenolipitoisuus oli 140–447 mg/100 g (tuorepainoa). Eräässä aiemmassa tutkimuksessa oli saatu vastaavanlaisia tuloksia tutkittaessa yhdeksää eri omenalajiketta (Imeh ja Khokhar 2002). Red Delicious -omenalajikeen kokonaisfenolipitoisuus oli suurimmasta päästä ja Empire-lajikkeen pienimmästä. Red

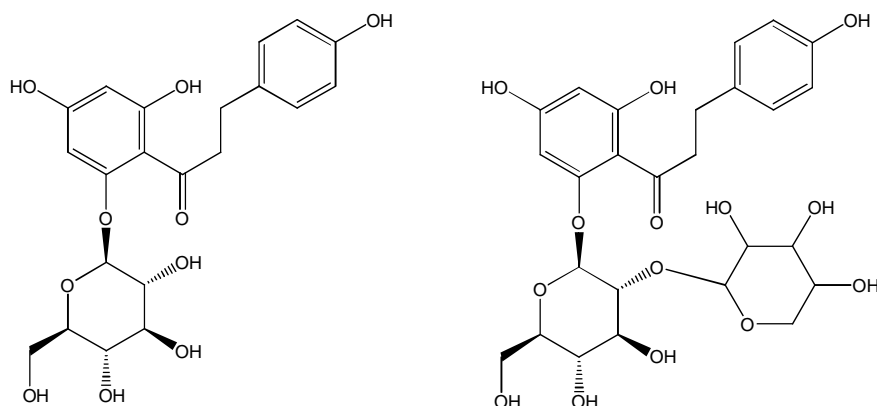
Delicious -omenoiden fenolisista yhdisteistä 80 % oli vapaassa muodossa, kun taas Empire-omenoiden fenoliset yhdisteet olivat konjugoituja. Glykosyloitumisen aste vaikutti myös yhdisteiden hapettumisreaktioita estäviin ominaisuuksiin.

Omenille tyypillisimpiä fenolisia yhdisteitä ovat kahvi- ja p-kumariinihapon esterit, flavanolit, kversetiinin ja isoramnetiinin glykosidit sekä dihydrokalkonit (liite 2) (Andrade ym. 1998; Schieber ym. 2001; Tsao ym. 2003; Alonso-Salces ym. 2004; Kahle ym. 2005; Cao ym. 2009). Klorogeenihappo (kuva 2) on havaittu tyypillisimmäksi yksittäiseksi yhdisteeksi useissa eri omenalajikkeissa, mm. Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji ja Ida Red -lajikkeissa (Tsao ym. 2003; Dragovic-Uzelac ym. 2005).

Kuva 2. Klorogeenihappo.



Vaikka omenan kuori kattaa omenan kokonaispainosta vain noin 6–8 %, monien fenolisten yhdisteiden pitoisuus on omenan kuoressa suhteessa huomattavasti suurempi kuin sisusosassa (Tsao ym. 2003; Łata ym. 2009). Keskimäärin 8 % omenan klorogeenihaposta, 24 % (+)-katekiinista, 32 % epikatekiinista ja jopa 50 % floritsiinista (floreitiini-2'-*O*-β-D-glukosidi) sijaitsee omenan kuoressa (Łata ym. 2009). Yhdisteryhmistä prosyanidiinit ovat yleisiä sekä omenan kuoressa (59,7 %) että sisusosassa (55,7 %) (Tsao ym. 2003). Floritsiini ja floretiiniksyloglukosidi (floreitiini-2'-*O*-β-D-(2''-*O*-ksylosyyli)-glukosidi) ovat puolestaan omenan yleisimmät dihydrokalkonit (kuva 3). Punakuoristen omenoiden (muun muassa lajikkeet Red Delicious, McIntosh, Empire, Ida Red, Northern Spy ja Cortland) antosyaaneja löytyi pääasiassa vain omenien kuorista.



Kuva 3. Floritsiini (floreitiini-2'-*O*-β-D-glukosidi) (vas.) ja floretiiniksyloglukosidi (floreitiini-2'-*O*-β-D-(2''-*O*-ksylosyyli)-glukosidi) (oik.).

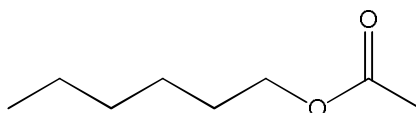
Floritsiinia ja floretiiniksyloglukosidia on pidetty vain omenille tyypillisinä merkkiyhdisteinä ja siten hyödynnetty hedelmätuotteiden väärennöstutkimuksissa (Versari ym. 1997; Dragovic-Uzelac ym. 2005). Esimerkiksi 5–10 % omenasosetta aprikoosinektariinin seasta tai 10–20 % omenasosetta aprikoosihillon seasta pystyttiin havaitsemaan dihydrokalkoniyhdisteiden avulla (Dragovic-Uzelac ym. 2005). Pieni määrä floritsiinia on kuitenkin havaittu myös mansikasta, mistä johtuen yhdisteen käyttäminen omenan taksonomisena merkkiyhdisteenä on kyseenalaista (Hilt ym. 2003). Havainnosta ei kuitenkaan ole tehty vahvistuksia muissa tutkimuksissa, ja floretiiniksyloglukosidia tai muita floretiini-yhdisteitä ei toistaiseksi ole havaittu mansikasta. Muut dihydrokalkoniyhdisteet saattavat siten soveltua omenan merkkiyhdisteiksi. Omenan fenolisten yhdisteiden joukosta on tunnistettu myös isoramnetiiniglukosidi-yhdisteitä, mm. isoramnetiini-3-glukosidi, jota pidettiin vain päärynälle tyypillisenä yhdisteenä ennen tutkimuksissa tehtyjä havaintoja (Schieber ym. 2002; Alonso-Salces ym. 2004).

2.3.2 Päärynä

Päärynät (*Pyrus communis*) ovat suosittuja hedelmiä makeutensa ja rakenteensa ansiosta sekä tunnistettavia ominaisen ja miedon maun ja aromin ansiosta. Päärynöitä tuotettiin vuonna 2013 yli 25 miljoonaa tuhatta tonnia (FAOSTAT 2015). Kiina on päärynöiden tärkein tuottajamaa (17 milj. tonnia). Päärynää tuotetaan myös Italiassa ja Argentiinassa (700 tuhatta tonnia), Intiassa ja Japanissa (300 t. tonnia) sekä Chilessä ja Algeriassa (200 t. tonnia). Euroopassa tärkein päärynälajike on Conference, ja esimerkiksi Belgian päärynäntuotannosta yli 75 % on tätä lajiketta (Pedreschi ym. 2009).

Päärynän aromiyhdisteet

Päärynälajikkeiden tyypilliset aromiyhdisteet ovat pääasiassa estereitä sekä muutamia alkoholeja ja aldehydejä (liite 3). Esimerkiksi heksyyli- ja muut asetaattiesterit ovat hyvin tyypillisiä aromiyhdisteitä päärynälle (kuva 4) (Chervin ym. 2000; Riu-Aumatell ym. 2004).



Kuva 4. Heksyyliasetaatti.

Riu-Aumatell ym. (2004) tutkivat 11 kaupallisen päärynämehun (ei lajiketietoja, hankittu Italiasta ja Espanjasta) aromiyhdisteitä. Havaituista yhdisteistä vain heksyyliasetaatti ja etyyli-(E,Z)-2,4-dekadienoaatti esiintyivät kaikissa mehunäytteissä. Chervinin ym. (2000)

tutkimuksessa oli havaittu myös alkoholeja (fenyylietanoli ja dodekanoli) sekä aldehydyhdisteitä (2-heksenaali, nonanaali ja 2-oktenaali).

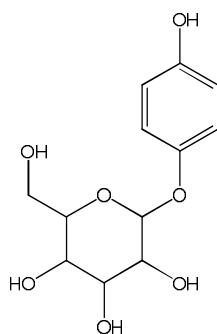
Päärynän fenoliset yhdisteet

Päärynän fenolisia yhdisteitä tutkineet ryhmät ovat havainneet merkittäviä eroja fenolisten yhdisteiden pitoisuustasoissa eri päärynälajikkeiden välillä. Esimerkiksi Keversin ym. (2011) tutkimuksissa päärynöiden fenolipitoisuus oli 109–304 mg/100 g (tuorepainoa). Conference-lajikkeen fenolipitoisuus oli noin 158 mg/100 g. Vastaaventyypisiä tuloksia on saatu aikaisemmissakin tutkimuksissa. Conference-lajikkeen päärynöiden on todettu sisältävän vähemmän fenolisia yhdisteitä verrattuna moneen muuhun lajikkeeseen, kuten lajikkeisiin Forelle, Taylor's, Peckham's ja Rocha (Escarpa ja Gonzáles 2000; Imeh ja Khokhar 2002; Salta ym. 2010).

Sekä päärynän kuoressa että sisuksessa pääasiallisia fenolisia yhdisteitä ovat klorogeenihappo, kahvihappo, kumariinihapot, ferulahappo, arbutiini, (-)-epikatekiini sekä erilaiset prosyaniidiinien ja flavonolien glykosidit (liite 4) (Escarpa ja Gonzáles 2000; Schieber ym. 2001; Salta ym. 2010). Vastaavia fenolisia yhdisteitä on havaittu myös päärynästä tehdyssä mehussa (Tanrıöven ja Ekşi 2005). Päärynän Rocha-lajikkeen fenolisten yhdisteiden joukosta on havaittu myös syreeninihappoa, jota on aiemmin pidetty kurpitsalajikkeille tyypillisenä merkkiyhdisteenä (Salta ym. 2010). Päärynälajikkeiden ei ole havaittu sisältävän omenalle tyypillistä floritsiinia (Tanrıöven ja Ekşi 2005).

Arbutiini on pienikokoinen, poolinen fenolinen yhdiste, joka koostuu yhdestä glykosyloidusta fenolisesta renkaasta (kuva 5). Arbutiinia on pidetty päärynälle tyypillisenä yhdisteenä, mutta sen havaitseminen näytteistä voi olla haastavaa (Tomás-Lorente ym. 1992; Andrade ym. 1998; Schieber ym. 2001). Esimerkiksi HPLC-määrityksessä arbutiini saattaa eluoitua samanaikaisesti sokerien ja muiden poolisten yhdisteiden kanssa jäädessä määrityksessä huomaamatta. Myös isoramnetiini-3-glukosidia on ehdotettu päärynän fenoliseksi merkkiyhdisteeksi, mutta tästä yhdisteestä on tehty havaintoja myös omenasta (Schieber ym. 2002; Alonso-Salces ym. 2004).

Kuva 5. Arbutiini.



2.3.3 Kurpitsa

Kurpitsat (*Cucurpita sp.*) ovat yleisesti halvimmasta päästä vihanneksia ja niitä kasvatetaan laajasti eri puolilla maailmaa, sillä ne voivat kasvaa lajikkeesta riippuen hyvin erilaisissa ilmasto-olosuhteissa (Dragovic-Uzelac ym. 2005). Kurpitsoita tuotettiin vuonna 2013 yli 24 miljoonaa tuhatta tonnia, joista eniten Kiinassa (7 milj. tonnia) ja Intiassa (5 milj. tonnia) (FAOSTAT 2015). Joillakin kurpitsalajikkeilla on neutraali aromi ja maku, joten niitä voitaisiin helposti käyttää väärentämistarkoituksessa. Dragovic-Uzelacin ym. (2005) työryhmä käytti onnistuneesti esimerkiksi *Cucurpita pepo* Gleisdorff-lajiketta ja *Cucurpita maxima* Turkinja-lajiketta aprikoosinektareiden ja hillojen väärentämistutkimuksissa. Dragovic-Uzelacin työryhmän tutkimuksessa *Cucurbita moschata* Argenta-lajikkeella oli edellä mainittuja lajikkeita intensiivisempi aromi.

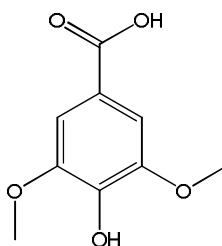
Kurpitsan aromiyhdisteet

Kurpitsan aromiyhdisteistä on tehty vain vähän tutkimuksia, mutta prosessoitujen kurpitsojen aromiin liitetyt yhdisteet ovat muun muassa aldehydejä, ketoneja ja alkoholeja (liite 5) (Kebede ym. 2014). Tämän tyyppisten haihtuvien yhdisteiden muodostuminen aiheutuu lämmityskäsittelyjen vaikutuksesta kemiallisten reaktioiden yhteydessä, kuten karotenoidien ja lipidien hajoamisreaktioissa tai Maillardin reaktiossa.

Kurpitsan fenoliset yhdisteet

Dragovic-Uzelacin ym. (2005) työryhmä tutki neljän eri kurpitsalajikkeen fenolisia yhdisteitä (*Cucurbita pepo* lajikkeet Gleisdorff ja Table Gold, *Cucurbita maxima* lajike Turkinja sekä *Cucurbita moschata* lajike Argenta) (liite 5). Klorogeenihappo oli kaikille lajikkeille tyypillisin fenolinen yhdiste. Syreeninihappoa (kuva 6) havaittiin myös kaikista lajikkeista. Kahvihappoa löydettiin kaikista lajikkeista vain vähän. p-kumariinihappoa löydettiin vain Argenta-lajikkeesta. Tulokset osoittivat, että fenolisten yhdisteiden määrä ja laatu vaihteli lajikkeiden välillä. Erilaisilla maantieteellisillä alueilla kasvaneissa *Cucurbita pepo* lajikkeissa (Gleisdorff ja Table Gold) klorogeenihapon pitoisuus vaihteli, kun taas maantieteelliset vaihtelut eivät vaikuttaneet syreeninihapon pitoisuuteen. Syreeninihapon pitoisuus pieneni kuitenkin 5–6 % valmistettaessa kurpitsasta sosetta.

Kuva 6. Syreeninihappo.



Syreeninihappo havaittiin HPLC-DAD-menetelmällä aprikoosinektareiden ja -hillojen joukosta, jotka sisälsivät 5 %, 10 % tai 15 % kurpitsasosetta (Dragovic-Uzelac ym. 2005). Alle 10 % lisäys ei aiheuttanut muutoksia aprikoosinektariinin tai -hillon aistittavaan laatuun. Dragovic-Uzelacin ym. (2005) tutkimuksessa syreeninihappoa ehdotettiin kurpitsalajikkeiden tyypilliseksi merkkiyhdisteeksi, mutta yhdiste on havaittu myös päärynästä (Salta ym. 2010).

2.4 MANSIKKA

Tämän tutkimuksen kohteena oleva mansikka (*Fragaria sp.*) on ruusukasvien heimoon (*Rosaceae*) kuuluva marja, jonka syötävä osa on paisunut, mehukas kukkapohjus (Deuel ja Plotto 2004; Kotimaiset kasvikset ry. 2014). Mansikka mielletään tavallisesti marjaksi, vaikka kasvitieteellisesti katsottuna se on oikeastaan hedelmä. Mansikka on suosittu marja niin maukkaan ja makean makunsa ansiosta kuin terveellisyytensä ansiosta. Mansikkalajikkeita on useita kymmeniä, mutta yleisimmät lajikkeet ovat suuren ja makean puutarhamansikan (*Fragaria x ananassa*) lajikkeita (Kotimaiset kasvikset ry. 2014). Suomessa yleisimpiä viljeltäviä puutarhamansikan lajikkeita ovat muun muassa Jonsok, Polka, Bounty, Honeyoe, Korona ja Senga Sengana.

Mansikka on ylivoimaisesti suosituin ja tuotetuin suomalainen marja. Vuonna 2013 Suomessa tuotettiin 16 miljoonaa kiloa marjoja noin 6000 hehtaarin alalla (Puutarhatilastot 2013). Mansikan osuus tästä oli noin 13 miljoonaa kiloa ja 3400 hehtaaria. Maailmanlaajuisesti tuoretta mansikkaa tuotettiin vuonna 2013 vajaa 8 miljoonaa tuhatta kiloa, joka on noin kymmenesosa omenan vuosittaisesta tuotannosta (FAOSTAT 2015). Suurimmat mansikan tuottajamaat ovat Kiina, Espanja ja Yhdysvallat. Mansikkaa tuotetaan tuhansia kiloja myös Meksikossa, Saksassa, Venäjällä, Puolassa ja Marokossa, viimeisimmissä etenkin teolliseen käyttöön. Suomeen tuoretta mansikkaa tuodaan kuitenkin eniten Belgiasta ja Alankomaista. Esimerkiksi vuonna 2006 Puolan mansikan tuotannosta jopa 60–70 % oli suunnattu prosessoitavaksi pääasiassa hillo-, mehu-, ja marjavalmisteteollisuuteen (EU raportti 2006). Lyhyen kasvukauden ja tuoresäilyvyysajan vuoksi mansikasta tehdäänkin erilaisia hilloja, mehuja ja pakasteita niin kotiloissa kuin teollisesti. Teollisessa käytössä yleisesti käytetty lajike on ollut Senga Sengana (EU raportti 2006). Tämä johtuu lajikkeen ominaisuuksista, joita ovat esimerkiksi hyvä viljelykestävyys ja kannan helppo irtoavuus. Lajikkeen tuoresäilyvyysaika on kuitenkin lyhyt, mistä johtuen lajike ei sovellu tuoremarkkinoille. Myös Camarosa-lajiketta on

viljelty teolliseen käyttöön esimerkiksi Puolassa, Kiinassa ja Marokossa. Hilloina ja hyytelöinä sekä muilla tavoin säilöttynä mansikkaa tuotiin Suomeen vuonna 2013 yhteensä 1660 tuhatta kiloa ja vuonna 2014 1652 tuhatta kiloa (Tullihallitus Tilastopalvelu 2015). Suomeen tuodaan siten suuret määrät mansikkatuotteita, jolloin joukossa saattaa olla joitain väärennettyjä tuotteita. Mansikkahillo on muutenkin helppo kohde väärentämiselle, sillä mansikan voimakas aromi ja väri peittävät helposti miedomman hajuisen tai värisen raaka-aineen lisäyksen.

Tuore mansikka koostuu pääasiassa vedestä, mutta se sisältää runsaasti myös monenlaisia ravintoaineita (Kotimaiset kasvikset ry. 2014) Energiaravintoaineista mansikka sisältää eniten hiilihydraatteja (8,4 g/100 g), joista suurin osa on sokereita (Fineli 2014a). Ravitsemuksen kannalta mansikka on esimerkiksi hyvä C-vitamiinin ja folaattien lähde. C-vitamiinia tuore mansikka sisältää noin 60 mg/100 g ja folaatteja 35,6 µg/100 g (Fineli 2014a). Mansikka sisältää ravintoaineiden lisäksi myös satoja haihtuvia ja haihtumattomia yhdisteitä, jotka ovat seurausta kasvin kypsymisestä ja aineenvaihdunnasta (Kammerer ym. 2012). Näitä yhdisteitä ovat esimerkiksi aromiyhdisteet ja fenoliset yhdisteet.

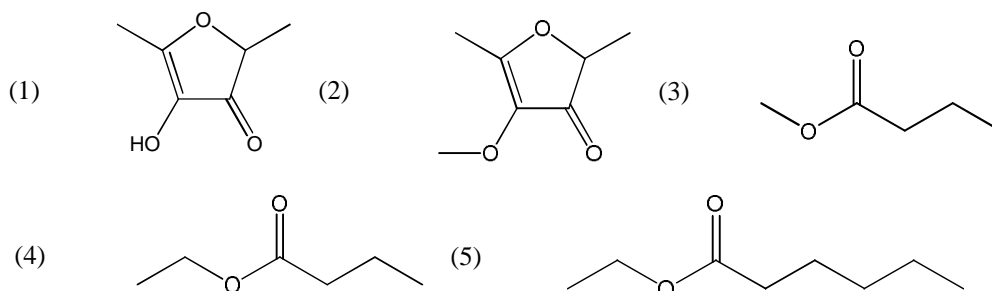
Muun muassa prosessointi vaikuttaa mansikan ravintoaineisiin ja muihin yhdisteisiin. Prosessoinnista johtuen mansikkahillo sisältää C-vitamiinia vain noin 20 mg/100 g ja folaatteja 12 µg/100 g (Fineli 2014b). Hilloksi keittäminen vaikuttaa myös haihtuvien ja haihtumattomien yhdisteiden pitoisuuksiin ja voi vaikuttaa myös kvalitatiiviseen profiiliin. Katsauksessa on seuraavaksi tarkasteltu mansikalle tyypillisiä aromi- ja fenoliyhdisteitä sekä niiden mahdollista säilyvyyttä prosessoinnissa.

2.4.1 Mansikan aromiyhdisteet

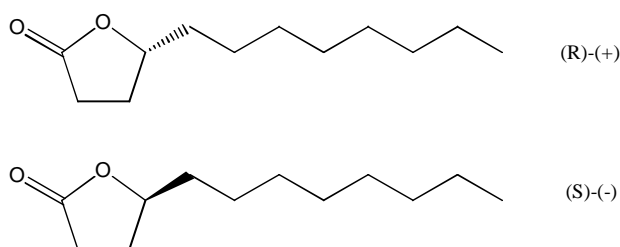
Tuoreen mansikan ominainen punainen väri, mehukas koostumus, tyypillinen aromi ja makean hedelmäinen flavori tekevät mansikasta erittäin suositun marjan (Schwieterman ym. 2014). Mansikoilla on monipuolinen aromi, joka koostuu yli 350 tunnistetusta haihtuvasta yhdisteestä (Latrasse 1991; Hakala ym. 2002; Williams ym. 2005). Kemialliselta ryhmältään mansikka-aromin haihtuvat yhdisteet ovat muun muassa estereitä, aldehydejä, ketoneja, alkoholeja, happoja, terpeenejä ja furaaneja (liite 6) (Latrasse 1991; Zabetakis ja Holden 1997; Williams ym. 2005; Schwieterman ym. 2014). Näistä etenkin esterit vaikuttavat aromin intensiteettiin kaikissa marjan kypsymisen vaiheissa (Hakala ym. 2002; Schwieterman ym. 2014). Mansikan aromiin vaikuttavat yhdisteet voivat olla myös laktoneja, rikkiyhdisteitä, asetaaleja, fenoleja, epoksiedeja ja alkaaneja (Zabetakis ja Holden 1997; Zhang ym. 2011). Vaikka näiden ryhmien yksittäisiä

haihtuvia yhdisteitä on mansikassa vain hyvin pieninä pitoisuuksina, tyypillisesti 0,1–10 mg/kg tuorepainoa, niillä on merkittävä vaikutus mansikan kokonaisvaltaiseen flavoriin (Latrasse 1991; Zhang ym. 2011).

Mansikka-aromiin ei ole pystytty liittämään yhtä ainoaa tiettyä tyypillistä aromiyhdistettä. Furaneolia (2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3-[2H]-furanoni, DHF), mesifuraania (2,5-dimetyyli-4-metoksi-3-[2H]-furanoni, DMF), metyylibutanoaattia, etyylibutanoaattia ja etyyliheksanoaattia (kuva 7) pidetään kuitenkin merkittävimpinä mansikan aromiin vaikuttavina yhdisteinä (Deuel ja Plotto 2004; Williams ym. 2005; Schipilliti ym. 2011). Muita mansikan aromiin vaikuttavia tärkeitä ja tyypillisiä haihtuvia yhdisteitä ovat muun muassa butyyliasetaatti, heksyyliasetaatti, cis-3-heksenyyliasetaatti, butyylibutanoaatti, heksyylibutanoaatti, metyyliheksanoaatti, oktyyliheksanoaatti, metyyliantranilaatti, oktyyli-isovaleraatti, heksanaali, E-2-heksenaali, Z-3-heksenaali, 2-pentanoni, 2-heptanoni, Z-3-heksenoli, linalooli, eugenoli, butaanihappo, 2-metyylibutaanihappo, heksaanihappo, oktaanihappo, γ -dekalaktoni, δ -dekalaktoni, γ -dodekalaktoni, Z-nerolidoli ja E-nerolidoli (liite 7) (Urruty ym. 2002; Azodanlou ym. 2003; Deuel ja Plotto 2004; De Boishbert ym. 2006; Schipilliti ym. 2011). Monet mansikan aromiyhdisteet ovat kiraalisia yhdisteitä ja voivat esiintyä raseemisina seoksina ja tietyssä enantiomeeri-suhteessa. Esimerkiksi furanonit ja laktonit, kuten γ -dodekalaktoni, ovat rasemaatteja (kuva 8) (Williams ym. 2005; Ravid ym. 2009).



Kuva 7. Mansikan aromiyhdisteitä. (1) Furaneoli (2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3-[2H]-furanoni, DHF), (2) mesifuraani (2,5-dimetyyli-4-metoksi-3-[2H]-furanoni, DMF), (3) metyylibutanoaatti, (4) etyylibutanoaatti ja (5) etyyliheksanoaatti.



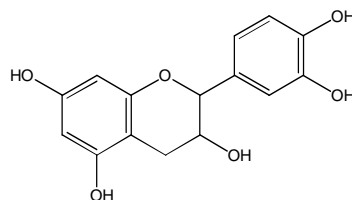
Kuva 8. γ -dodekalaktonin (R)-(+)- ja (S)-(-)-enantiomeerit.

Esterit (esimerkiksi metyyli- ja etyylibutanoaatti, metyyli- ja etyyliheksanoaatti sekä heksyyliasetaatti) vaikuttavat pääasiassa tuoreen mansikan kukkaismaisiin ja hedelmäisiin aromivivahteisiin, kun taas alkoholit ja aldehydit (esimerkiksi n-heksenaali, E-2-heksenaali, Z-3-heksenaali, ja E-2,4-nonadienaali) vaikuttavat tuoreeseen, viherkasvimaiseen ja lehtimäiseen vivahteeseen sekä pistävän kirpeisiin ja teräviin makuihin (Schieberle ja Hofmann 1997; Deuel ja Plotto 2004; Schipilliti ym. 2011). Laktonien tiedetään vaikuttavan oleellisesti ominaislaatuisiin ja selväpiirteisiin mansikan, persikan, aprikoosin ja monien muiden hedelmien aromeihin, ja linalooli on vastuussa sitrusmaisesta flavorista (Schipilliti ym. 2011). Virhearomeja mansikan flavoriin puolestaan aiheuttavat esimerkiksi etyyliasetaatin, asetaldehydin ja etanolin tuottaminen kasvin aineenvaihdunnassa (Hakala ym. 2002; Berna ym. 2007). Etenkin etyyliasetaatti on yksi tärkeimmistä mansikan virhearomeista.

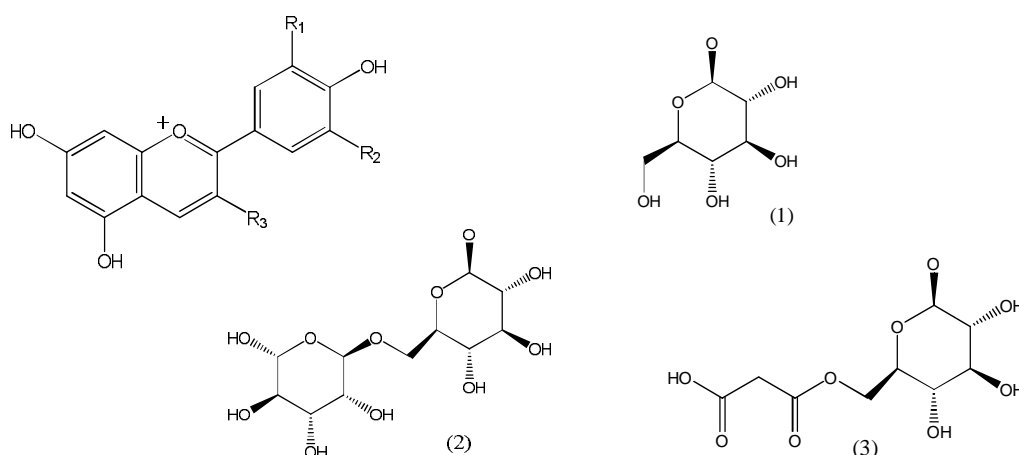
2.4.2 Mansikan fenoliset yhdisteet

Mansikan fenolisten yhdisteiden koostumuksesta on tehty monia tutkimuksia eri menetelmillä ja tulokset ovat toisistaan osittain poikkeavia. Pääasialliset mansikan fenolisten yhdisteiden ryhmät ovat kuitenkin tunnistettuja. Mansikka sisältää lukuisia fenolisia yhdisteitä, kuten flavanoleja, antosyaaneja, ellagitanniineja, flavonoleja sekä fenolisia happoja (liite 8) (Määttä-Riihinen ym. 2004). Keskimäärin mansikan tuorepainosta fenolisia yhdisteitä on 57–133 mg/100 g HPLC-DAD-MS:lla mitattuna ja 87–246 mg/100 g HPLC-DAD-MS-MS:lla mitattuna (Buendía ym. 2010; Aaby ym. 2012). Fenolisten yhdisteiden kvalitatiivisen koostumuksen on todettu vaihtelevan eri mansikkalajikkeiden välillä, vaikka fenolisten yhdisteiden kokonaispitoisuus olisi samankaltainen (Aaby ym. 2012). Yleisin mansikan fenolisiin yhdisteisiin glykosyloitu monosakkaridi on glukoosi (Aaby ym. 2007a).

Buendían ym. (2010) tutkimuksen mukaan flavonoidipolymeereihin kuuluvat proantosyanidiinit olivat mansikan pääasiallisin fenolisten yhdisteiden ryhmä käsittäen noin 60 % fenolisista yhdisteistä. Proantosyanidiinit koostuvat kahdesta tai useammasta flavanoli-yksiköistä. Aabyn ym. (2012) työryhmä ei saanut vastaavia tuloksia käyttäessään eri menetelmää. Flavanolien osuus mansikan fenolisista yhdisteistä oli Aabyn ym. (2012) tutkimuksessa 28–40 %. Mansikan flavanoleista tyypillisin yhdiste on (+)-katekiini (kuva 9) (Seeram 2006; Aaby ym. 2012; Álvarez-Fernández ym. 2014). Myös esimerkiksi prosyanidiinin dimeerejä, trimeerejä ja pentameerejä sekä propelargonidiineja on havaittu (Aaby ym. 2012).

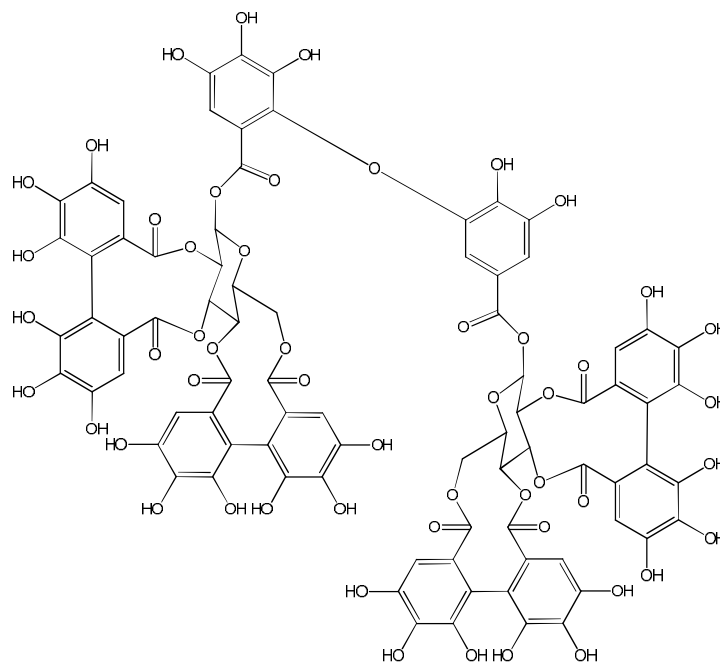
Kuva 9. (+)-katekiini.

Toinen merkittävä mansikan fenolisten yhdisteiden ryhmä on flavanoleja muistuttavat antosyaanit, jotka on havaittu myös mansikan suurimmaksi fenolisten yhdisteiden ryhmäksi kattaen 15–60 % fenolisista yhdisteistä. Buendía ym. (2010) tutkimuksessa antosyaanien osuus oli kuitenkin enimmillään noin 20 %. Yleisimmiksi mansikan antosyaaneiksi on tunnistettu muun muassa pelargonidiinin ja syanidiinin 3-glukosidit, 3-rutinosidit sekä 3-malonyyglukosidit (kuva 10) (Määttä-Riihinen ym. 2004; Seeram ym. 2006; Lopes da Silva ym. 2007; Buendía ym. 2010; Aaby ym. 2012). Mansikan kauniin punainen väri perustuu pääasiassa pelargonidiinin ja syanidiinin 3-glukosidien väriin (Deuel ja Plotto 2004).

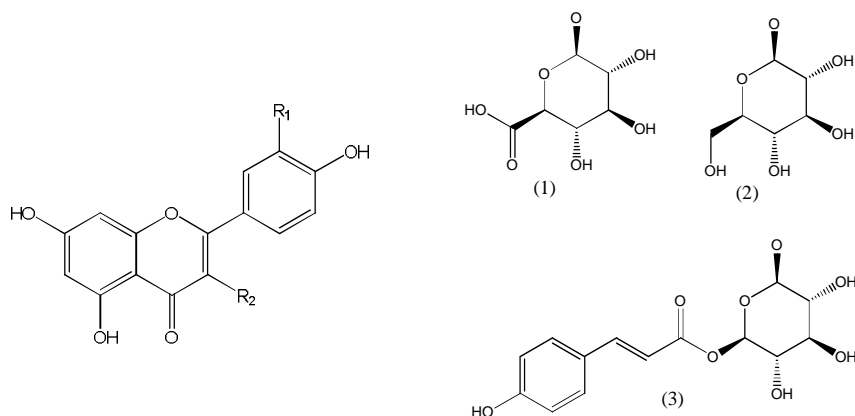
**Kuva 10.** Mansikan antosyaaneja. Pelargonidiini: R1 ja R2 = H, syanidiini: R1 = OH ja R2 = H. Vaihtelevat R3-ryhmät: (1) 3-*O*-glukosidi, (2) 3-*O*-rutinosidi, (3) 3-*O*-(6'-*O*-malonyyglukosidi).

Ellagitanniinit ovat mansikan fenolisten yhdisteiden ryhmä, joka käsittää 14–23 % eli kolmanneksi suurimman osan mansikan fenolisista yhdisteistä (Aaby ym. 2012). Aikaisemmassa tutkimuksessa ellagitanniinit on todettu myös suurimmaksi tai toiseksi suurimmaksi mansikan fenolisten yhdisteiden ryhmäksi (Kähkönen ym. 2001; Määttä-Riihinen ym. 2004). Mansikasta on löydetty muun muassa bis-HHDP-galloyyylglukoosin dimeeriä, agrimoniinia (kuva 11), joka on pääasiallinen mansikan ellagitanniini (Aaby ym. 2012; Vrhovsek ym. 2012). Agrimoniinia on ehdotettu myös *Fragaria*-suvun kasvien kemotaksonomiseksi merkkiyhdisteeksi (Okuda ym. 1992; Aaby ym. 2012). Mansikalle tyypillisiä muita ellagitanniineja ovat esimerkiksi bis-HHDP-galloyyylglukoosi ja sen muut johdannaiset, kuten sanguiniini H6 sekä lambertianiini C (liite 9) (Määttä-Riihinen ym.

2004; Seeram ym. 2006; Buendía ym. 2010; Aaby ym. 2012; Gasperotti ym. 2013). Mansikan flavonoleista puolestaan keskeisimpiä ovat kversetiinin ja kampferolin 3-glukuronidit, 3-glukosidit sekä 3-p-kumaryyliglukosidit (kuva 12) (García-Viguera ym. 1997; Lopes da Silva ym. 2007; Seeram ym. 2006; Buendía ym. 2010; Aaby ym. 2012; Álvarez-Fernández ym. 2014). Flavonolien osuus tuoreen mansikan fenolisista yhdisteistä on vain muutaman prosentin verran, keskimäärin noin 3 % (Aaby ym. 2012).



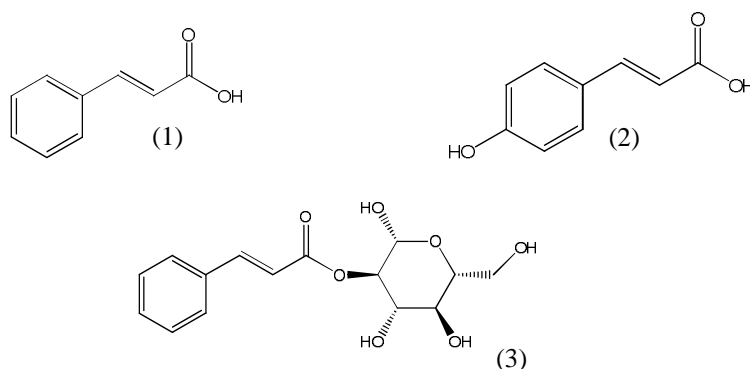
Kuva 11. Agrimoniini.



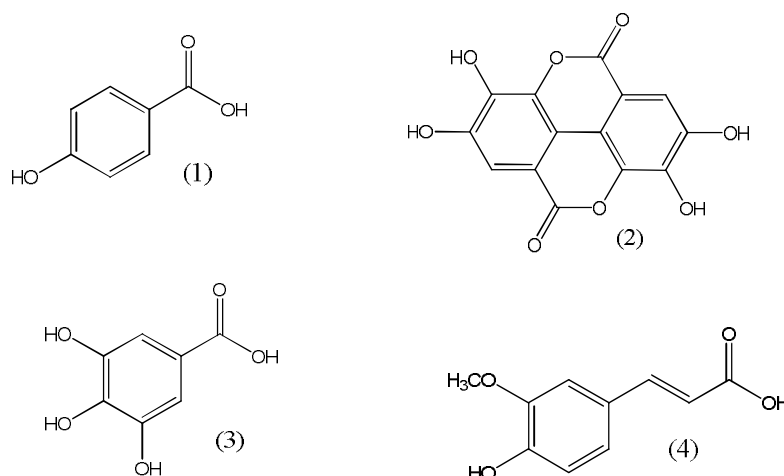
Kuva 12. Mansikan flavonoleja. Kversetiini: R1 = OH, kampferoli: R1 = H. Vaihtelevat R2-ryhmät: (1) 3-*O*-glukuronidi, (2) 3-*O*-glukosidi, (3) 3-*O*-(6-p-kumaryyli)glukosidi.

Mansikan kypsyessä fenolisista hapoista muodostuu aineenvaihdunnan vaikutuksesta monenlaisia johdannaisia ja niiden isomeerejä. p-kumariinihappo on kanelihapon johdannainen eli niin sanottu hydroksikanelihappo (kuva 13), ja se on yksi tyypillisimmistä mansikan fenolisista hapoista (Määttä-Riihinen ym. 2004). Kanelihappo ei ole fenolinen happo, mutta toimii lähtöaineena muun muassa hydroksikanelihapoille ja flavonoideille

fenyylipropanoidi-aineenvaihduntareitillä. p-kumariinihaposta muodostuu mansikkaan muun muassa p-kumaryyglukosideja, jotka glykolysoituvat esimerkiksi flavonolien kanssa (kuva 12) (Buendía ym. 2010; Aaby ym. 2012). Kinnamyyliglukoosin osuus mansikan fenolisista yhdisteistä voi olla jopa 6–30 % (kuva 13). Muita tyypillisiä happoja ovat esimerkiksi hydroksibentsoehappo, ellagihappo, gallushappo ja ferulahappo (kuva 14) sekä niiden johdannaiset muiden fenolisten yhdisteiden ja sakkaridien kanssa (Kähkönen ym. 2001; Määttä-Riihinen ym. 2004; Mattila ym. 2006; Seeram ym. 2006; Aaby ym. 2012). Ellagihapon johdannaisten osuus kaikista mansikan fenolisista yhdisteistä on keskimäärin vain noin 1 % (Aaby ym. 2012). Mansikan fenolisista yhdisteiden joukosta on löydetty myös pieni määrä floritsiinia (kuva 3) (Hilt ym. 2003). Floritsiiniä oli aiemmin pidetty vain omenalle tyypillisenä yhdisteenä, ja sitä on käytetty omenan merkkiaineena elintarvikkeiden väärennösepäilyissä. Kattavia seulonta- ja profilointitutkimuksia tarvitaan silti edelleen vahvistamaan ja selkeyttämään dihydrokalkoniyhdisteiden havaitsemisesta mansikasta.



Kuva 13. (1) Kanelihappo, (2) p-kumariinihappo (hydroksikanelihappo) ja (3) kinnamyyliglukoosi.



Kuva 14. (1) Hydroksibentsoehappo, (2) ellagihappo, (3) gallushappo ja (4) ferulahappo.

2.5 MERKKIYHDISTEISIIN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

2.5.1 Aromiyhdisteisiin vaikuttavat tekijät

Kasvin aromiyhdisteiden monimuotoisuutta lisää se, että haihtuvien aromiyhdisteiden profiili vaihtelee lajikkeiden välillä eli genotyyppi vaikuttaa koostumukseen (Hakala ym. 2002). Myös saman lajikkeen koostumus voi vaihdella kypsymiskauden, vuodenajan ja kasvuvuoden mukaan sekä kasvuympäristön ja -ilmaston vaihteluiden vaikutuksesta (Hakala ym. 2002; Williams ym. 2005). Kasvuvuosi vaikutti voimakkaammin mansikan tärkeimpiin aromiyhdisteisiin kuin lajike, ja tiettyjä yhdisteitä havaittiin vain tietyssä vuonna ja tietyissä lajikkeissa.

Aromiyhdisteiden määrät voivat muuttua myös luonnostaan sadonkorjuun jälkeen tai prosessoinnin vaikutuksesta. Esimerkiksi metyylibutanoaatin ja -heksanoaatin pitoisuudet pienenevät tuoreessa mansikassa sadonkorjuun jälkeen, kun taas furaneolin, mesifuraanin ja nerolidolin määrät kasvoivat varastoinnin aikana (Williams ym. 2005; Berna ym. 2007). Pitkän varastointiajan vaikutus tuoreen mansikan aromiyhdisteisiin oli merkittävämpi kuin erilaisten säilytysolosuhteiden vaikutus (pakastus, kylmävarastointi, huoneenlämpö ym.) (Deuel ja Plotto 2004; Berna ym. 2007). Suuri määrä haihtuvia aromiyhdisteitä menetetään valmistettaessa tuoreesta hedelmästä hilloa avoimessa ilmatilassa (Lesschaeve ym. 1991; Deuel ja Plotto 2004). Vakuumikattilassa valmistettaessa haihtuvat yhdisteet kondensoituvat ja säilyvät tuotteessa paremmin. Näin saadaan laadultaan parempi hillo, jonka aromikoostumus vastaa enemmän tuoreen hedelmän koostumusta.

Omenan ja päärynän aromiyhdisteiden tuotto on ainakin osittain riippuvaista etyleenin tuotosta (Fan ym. 1998). Tiettyjen haihtuvien estereiden synteesi on riippuvaista jatkuvasta etyleenin toiminnasta ja suuresta etyleenin tuottoasteesta. Pidennetty varastointiaika suojakaasuissa vaikuttaa aromiyhdisteiden tuottoon ja saattaa vähentää myös omenan herkkyyttä etyleenin vaikutuksille (Bangerth 1984; Saevels ym. 2004). Saevelsin ym. (2004) työryhmä havaitsi positiivisen korrelaation suojakaasujen vaikutuksen ja varastoitujen omenoiden aromiprofiiliin välillä. Omenat sisälsivät suurempia määriä α -farneseenia kuin tavallisessa ilmassa ja viileässä varastoidut omenat.

2.5.2 Fenolisiin yhdisteisiin vaikuttavat tekijät

Kuten aromiyhdisteiden profiilin, myös fenolisten yhdisteiden koostumuksen on todettu olevan tyypillinen kullekin mansikkalajikkeelle ja genotyypille (Carbone ym. 2009; Aaby ym. 2012; Gasperotti ym. 2013; Josuttis ym. 2013). Mansikan kypsyessä fenolisten

yhdisteiden aineenvaihdunnassa tapahtuu suuria muutoksia, ja mansikan värin tummuessa etenkin antosyaanien määrä voi jopa kolminkertaistua (Aaby ym. 2012). Kasville itselleen fenoliset yhdisteet toimivat suoja-aineina ympäristön uhkia vastaan, ja kasvuolosuhteet ja -ympäristö voivatkin vaikuttaa hedelmän tai marjan fenolisten yhdisteiden vaihteluun niin lajikkeiden välillä kuin lajikkeen sisällä. Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että Tanskassa kasvatettujen mansikoiden kokonaisfenolipitoisuus oli suurempi ja antosyaanien pitoisuus pienempi kuin Saksassa kasvatettujen saman lajikkeen mansikoiden pitoisuudet (Josuttis ym. 2013). Ero saattoi johtua erilaisista kasvulämpötiloista (lämpimämpi kasvuympäristö voi johtaa suurempaan antosyaanien pitoisuuteen) mutta myös muun muassa sateiden ja auringonvalon määrän sekä päivien pituuden vaihtelut tai muut kasvien kasvua luonnollisesti hidastavat stressitekijät, kuten ravinteiden niukkuus, voivat vaikuttaa pitoisuuseroihin. Joidenkin luomuhedelmien ja -marjojen lajikkeissa, kuten mansikan lajike Jonsokissa, fenolisia yhdisteitä on havaittu olevan noin 12 % enemmän kuin tavallisesti viljellyissä marjoissa (Häkkinen ja Törrönen 2000). Sekä tavallisissa Polka- ja Honeoye-lajikkeiden mansikoissa että luomumansikoissa fenolisten yhdisteiden pitoisuudet olivat kuitenkin vastaavat.

Koska mansikan kasvukausi on etenkin Suomessa ja muissa pohjoisissa maissa lyhyt, niistä tuotetaan monenlaisia tuotteita. Fenoliset yhdisteet ovat herkkiä hapettumaan ja hajoamaan, joten prosessoinnilla voi olla merkittäviä vaikutuksia mansikan fenolisten yhdisteiden määrään (Lee ym. 2004; Mazur ym. 2014). Prosessointitavasta riippuen mansikkahillon kokonaisfenolipitoisuus on keskimäärin kuitenkin vain noin 15 % pienempi kuin tuoreen mansikan (Klopotek ym. 2005; Aaby ym. 2007b). Hilloon lisättävä sokeri laimentaa jo itsessään fenoliyhdisteiden pitoisuuksia verrattuna tuoreeseen hedelmään. Antosyaanien pitoisuuden mansikkahillossa on raportoitu olevan jopa 20-40 %, flavanoidien 10-36 %, ellagitanniinien noin 20 % ja ellagihapon johdannaisien noin 20 % pienempi kuin tuoreen mansikan pitoisuuksien (García-Viguera ym. 1997; Häkkinen ym. 2000a; Aaby ym. 2007b; Carbone ym. 2009). Korkeassa lämpötilassa tehdyt käsittelyt vaikuttavat antosyaanien pitoisuuteen enemmän kuin paineistetut käsittelyt (Patras ym. 2009). Pastörointi pienensi tuotteen kokonaisfenolipitoisuutta noin 20 % (Hartmann ym. 2008). Fenolisista yhdisteistä muodostuu prosessoinnissa hajoamistuotteita sekä uusia kompleksisia yhdisteitä. Esimerkiksi vapaan ellagihapon pitoisuus voi olla mansikkasoseessa suurempi kuin tuoreessa mansikassa johtuen ellagitanniinien hajoamisesta (Kähkönen ym. 2001; Deuel ja Plotto 2004; Da Silva Pinto ym. 2007; Koponen ym. 2007). Mansikkatuotteiden flavonolien, antosyaanien ja ellagihappojen

pitoisuuksien on lisäksi havaittu pienentyvän varastoinnin aikana lämpötilasta riippumatta (Häkkinen ym. 2000a; Häkkinen ym. 2000b; Bursac Kovačević ym. 2009; Patras ym. 2011).

2.6 HILLOVÄÄRENNÖSTEN ANALYTIikka

Erilaisten aitojen ja väärentävien raaka-aineiden yhdistelmiä voi olla lähes rajaton määrä, sillä jo erilaisia väärentämistapoja on lukuisia. Väärentämisen monet muodot ovat haaste elintarvikeväärennösten analytiikalle, sillä väärennöstä ei yleensä havaita aistinvaraisesti. USP's Food Fraud -tietokannan tutkimuksista 95 % käsitteli korvaamiskategoriaa, joten myös väärennösten analytiikassa on keskitytty tähän väärennösmuotoon. Menetelmässä voidaan testata tietylle väärentämisessä käytetylle raaka-aineelle tyypillisen yhdisteen eli niin sanotun merkkiyhdisteen havaitsemista tai puuttumista tuotteesta, minkä pohjalta tuote voidaan todeta joko väärennökseksi tai aidoksi. Tässä lähestymistavassa merkittävänä rajoituksena on kuitenkin tuntemattomien merkkiyhdisteiden havaitseminen, sillä tämän tyyppisessä menetelmässä tuotteesta etsitään vain tiettyjä väärentävän raaka-aineen merkkiyhdisteitä. Merkkiyhdisteiden määrät ja koostumus aidoissa tuotteissa on myös tunnettava, että väärennoksen havaitsemista voidaan arvioida luotettavasti. Kaikki merkkiyhdisteet eivät välttämättä ole luonnollista alkuperää, joten myös synteettiset lisäaineena käytettävät yhdisteet (esimerkiksi aromi- ja väriaineet) tulisi ottaa huomioon.

Toisessa lähestymistavassa tuotteen ja raaka-aineiden koostumusta testataan kaikilta osin mitä se sisältää, ja mitä sen kuuluisi sisältää. Tässä lähestymistavassa etuna on se, että testauksessa saatetaan havaita myös tuntemattomat väärennöstä osoittavat merkkiyhdisteet. Väärennös saattaa silti jäädä havaitsematta, jos tuotteessa on vain hyvin pieni määrä väärentävää ainesosaa. Raaka-aineen korvaamisessa tavoitellaan kuitenkin maksimaalista hyötyä, joten useimmiten lisäyksen määrä on sen verran suuri, että se pystytään havaitsemaan analyttisin keinoin. Yhdistelemällä erilaisia määritysmenetelmiä saadaan paras varmuus väärennoksen havaitsemisesta tai toisaalta tuotteen aitoudesta.

Kasvipohjaisten tuotteiden aitouden analytiikka on lähinnä kemiallista. Raaka-aineiden kemialliset koostumustiedot ja niiden tutkiminen ovat keskeisessä asemassa kemiallisissa määrityksissä. Profiloititutkimuksia on tehty jo useita kymmeniä vuosia, mutta sopivien merkkiyhdisteiden löytäminen voi olla hidasta ja haastavaa. Kasvin kemiallinen koostumus voi vaihdella luonnollisesti monista eri syistä (lajikkeet, kasvin kypsyyssaste,

maantieteelliset kasvuolot, vuodenaika ym.) Lisäksi uusi tutkimustieto voi kumota vanhan tiedon, jolloin saatetaan joutua lähtöpisteeseen.

Erilaisia menetelmiä kasvipohjaisten tuotteiden, kuten hillojen, profiloimiseksi ja väärennösten havaitsemiseksi on kuitenkin onnistuttu kehittämään. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi GC- ja HPLC-menetelmät, gravimetria sekä infrapunaspektroskopia, joilla määritetään muun muassa haihtuvia yhdisteitä, pigmenttiyhdisteitä (kuten karotenoideja ja antosyaaneja), fenolisia yhdisteitä sekä sokereita tai muita hiilihydraatteja (Silva ym. 2000; Downey ja Kelly 2004; Fügél ym. 2004; Reid ym. 2004; Dragovic-Uzelac ym. 2005; Schieber ym. 2005; Kurz ym. 2008). HPLC ja infrapunaspektroskopia yhdistettynä kemometriisiin tulostenkäsittelymenetelmiin olivat tavallisimmat määrittäyskeinot USP's Food Fraud -tietokannan tutkimuksissa (Moore ym. 2012).

2.6.1 Aromiyhdisteiden analysointi

Elintarvikkeen maku, aromi ja tekstuuri muodostavat yhdessä kokonaisvaltaisen aistimuksen, jota kuvataan sanalla *flavori* (Grosch 2004). Aromi, eli haju, aiheutuu haihtuvista yhdisteistä, jotka aistitaan hajuaistin reseptorien avulla. Elintarvikkeen *flavorin* analysointi sisältää myös haihtuvien yhdisteiden määrittämisen ja tunnistamisen. Elintarvikkeiden aromiuutteet sisältävät yleensä suuren määrän haihtuvia yhdisteitä, joista vain pieni osa on aromiaktiivisia. Aromiaktiivisen haihtuvan yhdisteen pitoisuus ylittää hajukynnyksen eli aiheuttaa hajuaistimuksen. Eri hedelmillä ja marjoilla on todettu olevan erilaisia ja ominaisia aromiyhdisteiden profiileja, joten myös aromikoostumusten eroja on käytetty väärennösanalytiikassa (Ibáñez ym. 1998; Reid ym. 2004). Elintarvikkeiden haihtuvia aromiyhdisteitä voidaan määrittää esimerkiksi GC-menetelmillä.

GC on useissa tutkimuksissa yhdistetty SPME:oon haihtuvien aromiyhdisteiden määrittämiseksi (Reid ym. 2004; Williams ym. 2005; Schipilliti ym. 2011). SPME perustuu haihtuvien yhdisteiden eristämiseen näytteestä päällystetyn kuidun avulla (Grosch 2004). Aromiyhdisteet imeytyvät ensin kuituun, joka on yleensä upotettuna näytteen ilmatilaan riittävän pitkäksi aikaa. Natriumkloridin lisäys homogenoituihin näytteisiin edesauttaa haihtuvien yhdisteiden siirtymistä näytteestä ampullin ilmatilaan (De Boishébert ym. 2006; Ravid ym. 2009; Schillipiti ym. 2011). Uuton aikana ampullin ilmatilan ja kuidun välille muodostuu haihtuvien aromiyhdisteiden suhteen tasapainotila. Kun ilmatila ja kuitu ovat tasapainottuneet, aromiyhdisteet vapautetaan kuidusta lämmön avulla GC-injektioportissa määrittämistä varten. Uuttoaikana on kuidusta riippuen käytetty esimerkiksi 30–90 minuuttia ja vapautusaikana 2–10 minuuttia GC-injektioportissa (Reid

ym. 2004; Ravid ym. 2009). Erityisesti elintarvikenäytteissä suositetaan SPME:a, että vältyttäisiin näytteen haihtumattomien yhdisteiden mahdolliselta kontaminoivalta vaikutukselta. SPME ei myöskään vaadi yhdisteiden derivatisointikäsittelyjä kuten moni muu menetelmä GC-määrittämisen onnistumiseksi.

SPME on riippuvainen yksittäisten yhdisteiden höyrynpaineesta ja kaasufaasin tasapainottumisesta (Williams ym. 2005). Helpommin haihtuvat yhdisteet uuttuvat määrittämisessä helpommin ja näyttäytyvät GC-kromatogrammissa suhteellisesti suurempana pitoisuutena. Tämä antaa kuvan yhdisteiden vaikutuksesta marjan aromiin, mutta ei välttämättä anna todellista tietoa kasvin yhdisteiden konsentraatioista. Automatisoitu SPME manuaalisen SPME:n sijaan voi taata toistettavamman haihtuvien yhdisteiden määrittämisen. Vakioituissa ja automatisoiduissa olosuhteissa SPME:a voidaan käyttää myös kvantitatiiviseen määrittämiseen, kun otetaan huomioon näytteen aromiyhdisteiden tasapainottumisen erot ilmatilassa.

Esimerkiksi mansikan ja mansikasta valmistettujen hillojen aromiyhdisteiden tutkimuksissa on käytetty 100 µm:n poolitonta PDMS-kuitua (Reid ym. 2004; Williams ym. 2005). PDMS-kuidun lisäksi uudemmissa aromikoostumustutkimuksissa on käytetty myös 65 µm:n bi-polaarista polydimetyylisiloksaani-divinylibentseeni (PDMS-DVB) -kuitua (De Boisherebert ym. 2006; Ravid ym. 2009) sekä 50/30 µm:n polydimetyylisiloksaani-karbokseeni-divinylibentseeni (PDMS-CAR-DVB) -kuitua (Aprea ym. 2011; Schillipiti ym. 2011). PDMS-DVB-kuitu saattaa olla hieman kestävämpi kuin PDMS-CAR-DVB-kuitu. Kolmen erilaisen pintamateriaalin ansiosta erilaisten aromiyhdisteiden uuttuminen voi kuitenkin olla monipuolisempaa käytettäessä PDMS-CAR-DVB-kuitua. Aprean ym. (2011) ja Schillipitin ym. (2011) työryhmät valitsivat tutkimuksiinsa PDMS-CAR-DVB-kuidun, sillä erityisesti esterien, laktonien ja terpenoidien uuttumista haluttiin varmistaa.

SPME-GC-menetelmiä on käytetty esimerkiksi mansikkatuotteiden ja mansikka-aromilla maustettujen elintarvikkeiden oikeellisuuden määrittämiseen (Reid ym. 2004; Schipilliti ym. 2011). Reidin ym. (2004) tutkimuksessa väärentämiseen käytettiin omenasosetta, jota lisättiin erilaisina pitoisuuksina mansikkasoseisiin. Väärentävän raaka-aineen havaitseminen mansikkasoseesta todettiin mahdolliseksi SPME-GC-menetelmää käyttäen. Menetelmää voitiin hyödyntää väärentävän raaka-aineen tunnistamisessa käyttäen hyväksi havaittuja merkkiyhdisteitä. Schipillitin ym. (2011) tutkimuksessa SPME-GC oli yhdistetty myös MS:aan. Näytteiden oikeellisuusaste saatiin selville määrittämällä lukuisten valittujen aktiivisten aromiyhdisteiden hiili-isotooppisuhteet tuoreista luomumansikoista.

SPME-GC-MS-menetelmiä on käytetty myös hedelmämeijerijien ja nektariinien haihtuvien yhdisteiden määrittämiseen, sekä hedelmien varastoinnin aikana tapahtuvan aromikoostumuksen muutosten seuraamiseen (Song ym. 1997; Riu-Aumatell ym. 2004; Saevels ym. 2004; Zierler ym. 2004).

Isotooppijakauman lisäksi myös enantioselektiivistä erottelua on kokeiltu luonnollisten aromien ja yksittäisten aromiyhdisteiden oikeellisuuden osoittamiseen (Grosch 2004). Enantioselektiivinen GC-GC osoittautui arvokkaaksi työkaluksi mansikan aromiyhdisteiden kiraalisten ominaisuuksien tutkimisessa, sillä kullekin haihtuvalle yhdisteelle tunnistettiin ainoastaan yksi enantiomeeri (Williams ym. 2005.) Alustavien tutkimusten perusteella furaneolin (-)-enantiomeeri ja linaloolin S-enantiomeeri tunnistettiin vallitseviksi muodoiksi tietyissä mansikkalajikkeissa. Myös γ -dekalaktoni on luotettava kiraalinen indikaattoriyhdiste mansikan flavorin stereoselektiivisessä analyysissä. γ -dekalaktonin (R)-(+)-enantiomeerin enantiomeerinen puhtaus oli 90–100 % (S)-(-)-enantiomeeriin verrattuna 11 mansikkalajikkeessa (Ravid ym. 2009). Määrittäminen tehtiin SPME-GC-MS:lla.

Injektioitapana aromiyhdisteiden GC-määrittämisessä on käytetty yleensä suoraa höyrystävää injektointia (engl. splitless) (Ravid ym. 2009; Schipilliti ym. 2011). Käytetyt kolonnit sisälsivät usein 5-prosenttisella fenyyllillä sidotun metyyliopolysiloksaani-kiinteäfaasin (De Boishebert ym. 2006; Schipilliti ym. 2011; Zhang ym. 2011). Kantokaasuna käytettiin heliumia (De Boishebert ym. 2006; Ravid ym. 2009; Schipilliti ym. 2011). Sopiva lämpötilaohjelma määrittyy kolonnin mukaan, mutta esimerkiksi Schipilliti ym. (2011) käyttivät seuraavaa ohjelmaa: aloituslämpötila 50 °C \rightarrow nosto 190 °C:een 3 °C/minuutissa \rightarrow nosto 280 °C:een 10 °C/minuutissa \rightarrow pito 280 °C:ssa 2 minuuttia, kokonaismäärittäisaika noin 58 min.

Massaspektrometrin ionilähteen lämpötila pidettiin 200 °C:ssa ja liitännän lämpötila 250 °C:ssa (Schipilliti ym. 2011; Zhang ym. 2011). Yhdisteet ionisoitiin 70 eV:n elektronionisaatiolla (Ravid ym. 2009, Zhang ym. 2011). Yhdisteiden ionisoituminen ja fragmentoituminen määritettiin skannausalueella m/z 40–600 (engl. full scan, total ion current). Yhdisteet tunnistettiin vertaamalla retentioaikoja ja massaspektrejä tunnettujen malliaineiden ja tietokantojen tietoihin (esim. NIST-kirjasto) (De Boishebert ym. 2006; Ravid ym. 2009; Schipilliti ym. 2011).

2.6.2 Fenolisten yhdisteiden analysointi

Fenoliset haihtumattomat yhdisteet ovat kasvien sekundaarisia aromaattisia aineenvaihduntatuotteita (Kammerer ym. 2012). Fenolisia yhdisteitä ja etenkin antosyaaneja on tutkittu paljon niiden terveysvaikutusten vuoksi (Kammerer ym. 2012). Marjojen fenoliset yhdisteet toimivat antioksidanteina ja ravinnosta saatuna niiden on tutkittu vaikuttavan elimistössä esimerkiksi hapettumis- ja tulehdusreaktioita sekä syövän kasvua estävästi ja hillitsevästi (Heinonen ym. 1998; Cooke ym. 2005; Wang ja Stoner 2008; He ja Giusti 2010).

Fenoliset yhdisteet ovat rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan hyvin vaihtelevia. Ne koostuvat vähintään yhdestä aromaattisesta renkaasta, johon on kiinnittynyt vähintään yksi hydroksyyli-ryhmä (Kammerer ym. 2012; Alarcon-Flores ym. 2014). Useimmat fenoliset yhdisteet ovat rakenteeltaan monimutkaisia ja moniin on liittynyt esimerkiksi mono- tai disakkaridi glykosididisidoksella. Fenoliset yhdisteet voidaan karkeasti jakaa tanniiniin, fenolipolymeereihin sekä muihin fenolisiin yhdisteisiin, kuten flavonoideihin, yksinkertaisiin fenoleihin, fenolisiin happoihin, kumariineihin, ksantoneihin, stilbeeneihin, ligniineihin ja lignaaneihin (liite 10) (Kammerer ym. 2012; Alarcon-Flores ym. 2014). Tanniiniset fenolit voidaan jakaa kondensoituneisiin ja hydrolysoituihin tanniineihin. Flavonoidit, joiden perusrakenne koostuu C6-C3-C6-rungosta, voidaan edelleen jakaa alaryhmiin: muun muassa antosyaanit, flavonolit, flavanolit (katekiinit ja tanniinit), kalkonit ja flavononit. Antosyaanit ovat tietyissä olosuhteissa punaisen, violetin ja sinisen sävyisiä värillisiä yhdisteitä, joita esiintyy luonnostaan marjoissa ja hedelmissä. Yhdistettä sanotaan antosyaaniksi, kun sokerimolekyyli on konjugoitunut antosyanidiiniin.

Jokaisella hedelmällä ja marjalla on oma tyypillinen fenolisten yhdisteiden koostumusprofiili, joka voidaan määrittää kemiallisin menetelmin. Tiedetyt fenoliset yhdisteet ovat lajityypillisiä taksonomisia merkkiihdisteitä, mistä johtuen fenolisia yhdisteitä voidaan käyttää hedelmä- ja marjapohjaisten tuotteiden väärennosten määrittämisessä.

Esikäsittely ja uutto

Fenoliset yhdisteet ovat luonteeltaan happamia ja liukoisuudeltaan hyvin vaihtelevia. Ne ovat herkkiä hapettumaan ja hajoamaan muun muassa valon ja lämmön vaikutuksesta. Näytteenkäsittely onkin useimmiten tärkein ja herkin vaihe fenolisten yhdisteiden määrittämisessä niiden kemiallisen luonteen vuoksi (Lee ym. 2004; Kammerer ym. 2012). Esikäsittelyssä fenoliset yhdisteet pyritään vapauttamaan ja puhdistamaan ympäröivästä

matriisista ja muista yhdisteistä, kuten hiilihydraateista, proteiineista ja lipideistä. Tämä voi vaatia myös happo- tai emäshydrolyysin näytematriisista ja kohdeyhdisteistä riippuen, esimerkiksi ellagitanniinien hajotus ellagihapoiksi (Häkkinen ym. 2000a; Lee ym. 2004).

Puhtaat orgaaniset liuottimet, kuten alkoholit, tai orgaanisten liuottimien ja veden seokset ovat tavallisimpia fenolisten yhdisteiden uuttamisessa käytettyjä liuottimia (Kammerer ym. 2012). Uutto asetonilla on todettu tehokkaammaksi kuin uutto metanolilla (García-Viguera ym. 1998; Aaby ym. 2007a). 70-prosenttisella asetonilla mansikan fenolisia yhdisteitä uuttui monipuolisemmin ja suurempina pitoisuuksina kuin 80-prosenttisella metanolilla. Myös vain pieninä pitoisuuksina esiintyviä yhdisteitä, kuten ellagihappoa, saatiin uuttumaan. Uuttomenettely oli lisäksi toistettavampi ja pektiinin sakkautumisesta aiheutuvat ongelmat pystyttiin välttämään. Näytteenkäsittely voitiin suorittaa alhaisessa lämpötilassa ($< 30\text{ °C}$), mikä on herkästi hajoavien yhdisteiden säilymisen kannalta oleellista (García-Viguera ym. 1998).

Fenolisten yhdisteiden uuttoon käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa perinteinen kiinteä-nesteuutto, ultraäänituutto, paineistettu nesteuutto (ASE), kiinteäfaasiuutto (SPE) sekä QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) -uutto, joka on eräänlainen SPE:n muoto (Lee ym. 2004; Kammerer ym. 2012; Alarcón-Flores ym. 2014). Nestemäisten näytteiden kohdalla myös suora injektointi määrittelylaitteistoon laimentamisen ja suodattamisen jälkeen voi olla mahdollinen (Kammerer ym. 2012).

Esimerkiksi Malmbergin (2010) työssä käytettiin perinteistä liuotinuuttoa pyörökolvilla haihduttaen. Liuotinuutossa on kuitenkin riski, että fenolisten yhdisteiden uuttuminen jää epätäydelliseksi (Kammerer ym. 2012). Yhdisteryhmien ja isomeerien rakenteet ja fysikokemialliset ominaisuudet voivat erota esimerkiksi liukoisuudessa ja hydrofobisuudessa niin paljon, että osa fenolisista yhdisteistä ei uutu yhden liuottimen perinteisessä uutossa. Yleisesti käytetty fenolisten yhdisteiden uuttomenetelmä on myös ultraäänituutto (Escarpa ja González 2000; Alarcón-Flores ym. 2014). Ultraäänituutto on edullinen menetelmä, koska uuttoaika ultraäänihauuteessa on lyhyt ja uuttoon tarvittavan orgaanisen liuottimen määrä pieni. Esimerkiksi Aabyn ym. (2007a ja 2012) tutkimuksissa on käytetty onnistuneesti ultraäänihaudetta fenolisten yhdisteiden uutossa pakastetuista tuoreista mansikoista.

Marjasoseiden ja -hillojen uuttomenetelmäksi on käytetty myös SPE:a (Kammerer ym. 2012). SPE voi olla hyvä ratkaisu jos näyte sisältää hyvin paljon sokeria tai näyte halutaan puhdistaa isokokoisemmista polymeerisistä fenolisista yhdisteistä, kuten ellagitanniineista.

Malmbergin (2010) tutkimuksessa paljon sokeria sisältänyt kuivattu mustikkänäyte puhdistettiin C18-kiinteäfaasiuuttopylväällä (Bond Elut 5 g; Varian). SPE:lla voidaan puhdistaa näytteestä myös monia muita ei-fenolisia yhdisteitä, kuten aminohappoja, proteiineja ja hiilihydraatteja, jotka voisivat häiritä myöhempää kromatografiamäärittystä.

Myös QuEChERS-uuttoa on käytetty vihannesten ja hedelmien fenolisten yhdisteiden uuttoon (Silva ym. 2012). QuEChERS:in etuina ovat näytteenkäsittelyn yksinkertaisuus ja nopeus (Alarcón-Flores ym. 2014). QuEChERS perustuu kahteen työvaiheeseen. Ensin homogenoitu näyte uutetaan ja jaetaan sentrifugoimalla faaseihin orgaanisen liuottimen ja suolaseoksen avulla. Supernatantti uutetaan uudelleen ja puhdistetaan dispersiivisellä SPE:lla, jonka jälkeen näyte voidaan määrittää kromatografiatekniikoilla.

HPLC ja UHPLC

Yleisin fenolisten yhdisteiden analysointitapa on injektoida puhdistetut yhdisteet orgaanisessa liuottimessa HPLC-laitteistoon (Kammerer ym. 2012; Khoddami ym. 2013; Alarcón-Flores ym. 2014). Asetonitriiliin ja metanolin vesiseokset ovat tavallisimmat ajoliuokset fenolisten yhdisteiden kvantitoinnissa HPLC:lla (Kammerer ym. 2012; Alarcón-Flores ym. 2014). Molemmat ovat veden kanssa sekoittuvia, mutta metanoliin nähden asetonitriilillä on alhaisempi viskositeetti. Lisäksi asetonitriilillä on alhainen reaktiotaipumus, eli se ei ionisoi fenolisia yhdisteitä ajon aikana. Yleensä ajoliuokseen lisätään puskuriksi happoa, esimerkiksi muurahais- (HCOOH), etikka- tai trifluorietikkahappoa (TFA), että ajoliuoksen pH pysyisi välillä 2–4 ja välttyttäisiin fenolisten OH-ryhmien dissosioitumiselta. Puskuriliuoksen lisäyksellä pyritään säilyttämään myös fenolisten yhdisteiden aromaattisten rengasrakenteiden hydrofobiset ominaisuudet, jotka takaavat vuorovaikutukset poolittoman kolonnimateriaalin kanssa sekä paremman resoluution. Ajoliuoksen koostumusta voidaan muuttaa gradientin avulla ajon aikana, että erilaiset fenoliset yhdisteet saadaan erottumaan. Yleensä ajoliuos joudutaan valitsemaan kompromissina optimaalisen kromatografisen erottumisen ja ilmaisemismenetelmän vaatimusten välillä. Esimerkiksi jos ilmaisimena käytetään massaspektrometria, myös riittävä ionisoitumistehokkuus ja MS-suorituskyky on otettava huomioon (Alarcón-Flores ym. 2014). Malmbergin (2010) tutkimuksessa ajoliuoksena käytettiin kahdesta liuosseoksesta koostuvaa gradienttia: 0,05 % TFA:a + 0,95 % HCOOH :a vedessä (pH 2) ja 0,05 % TFA:a + 0,45 % HCOOH :a asetonitriilissä. Gradienttien muodostamiseen on käytetty myös seuraavia liuoksia: 0,1 % HCOOH :a vedessä + 20 % metanolia vedessä sekä 2 % HCOOH :a vedessä + asetonitriili (Aaby ym. 2012; Silva ym. 2012).

Fenolisten yhdisteiden analyysissä HPLC-kolonnit ovat yleensä 10–30 cm pitkiä kolonneja, joiden halkaisija on 3,9–4,6 mm ja partikkelikoko 3–10 µm (Riekkola ja Hyötyläinen 2000; Khoddami ym. 2013). Virtauksen tulee olla pulssitonta, mistä johtuen ajoliuospumppujen tulee olla tehokkaasti ja tarkasti toimivia. Yleisimmin HPLC-kolonneissa käytetään silikapartikkeleita, joihin on kemiallisesti sidottu sopiva yhdisteryhmä (esim. C18) (Riekkola ja Hyötyläinen 2000). Silikan pintaan on suhteellisen helppo sitoa erilaisia yhdisteryhmiä johtuen pinnan hydroksyyli-ryhmien (SiOH) reaktiivisuudesta. Fenolisten yhdisteiden analysoinnissa on C18-faasin sijaan käytetty esimerkiksi myös C12-käänteisfaasikolonnia (Aaby ym. 2012). Useimmat fenolisten yhdisteiden HPLC-määritykset suoritetaan huoneenlämmössä (Khoddami ym. 2013).

Fenolisten yhdisteiden erottuminen käänteisfaasikolonnissa perustuu yhdisteiden erilaisiin poolisuuksiin (Kammerer ym. 2012; Khoddami ym. 2013). Fenoliset yhdisteet voidaan erottaa myös normaalifaasilla, mutta käänteisfaasi on käytetympi (Khoddami ym. 2013). Käänteisfaasinestekromatografiassa (RPLC) pooliset yhdisteet, kuten fenoliset hapot, eluoituvat ensin ja retentioaika kasvaa hydrofobisuuden kasvaessa (Riekkola ja Hyötyläinen 2000; Alarcón-Flores ym. 2014). Vähemmän polaariset yhdisteet kuten flavonolit (kampferolit, kversetiinit) eluoituvat myöhemmin (Alarcón-Flores ym. 2014). Polaarisuus kasvaa mikäli rengasrakenteen C4-, C2- ja C3-paikoissa on hydroksyyli-ryhmät. Yhdisteiden dissosiaatio vaikuttaa niiden hydrofiilisyyteen ja siten myös yhdisteiden eluutiojärjestykseen: ionisessa muodossa olevat yhdisteet ovat hydrofiilisempia (Riekkola ja Hyötyläinen 2000). Yhdisteiden dissosiaatioaste taas riippuu ajoliuoksen pH:sta, mistä johtuen fenolisten yhdisteiden analysoinnissa käytetään usein puskuriliuoksesta ja orgaanisesta liuottimesta koostuvia gradientteja pH:n säätämiseksi.

UHPLC:n toimintaperiaate on sama kuin HPLC:n. Ero menetelmien välillä löytyy kolonneista. UHPLC-kolonnit ovat pienempiä (esimerkiksi pituus alle 100 mm) ja niiden partikkelikoko on pienempi (esimerkiksi alle 2 µm vs. HPLC:n 3–10 µm). Lyhyemmän kolonnin ja pienemmän partikkelikoon ansiosta kokonaisajoajat ovat huomattavasti lyhyempiä kuin HPLC:ssa, tarvittavien ajoliuosten määrä on pienempi, kolonnit kestävät korkeampaa painetta ja kromatografinen erottuminen on tehokkaampaa. Sopivimmat ajoliuokset UHPLC:lle ovat samoja kuin HPLC:lle, eli vesi, metanoli, asetonitriili sekä veden sekoitukset metanolin tai asetonitriilin kanssa. Jatkuva UHPLC-menetelmien kehitys tuo uusia mahdollisuuksia myös fenolisten yhdisteiden määritykseen.

Ilmaiseminen

Fenolisten yhdisteiden aromaattisten rengasrakenteiden absorptiokyvyn ansiosta ne ilmaistaan usein UV/VIS-, DAD- tai fotodiodirivi-ilmaisimilla (PDA) (Lee ym. 2004; Kammerer ym. 2012; Khoddami ym. 2013). Käytetyt aallonpituudet ovat yleensä 190–380 nm. Perinteiseen UV/VIS-ilmaiseeseen verrattuna DAD on huomattavasti tehokkaampi analysoitaessa fenolisten yhdisteiden seoksia, joissa on useita erityyppisiä yhdisteitä.

MS on toinen menetelmä, jonka avulla kaikki fenoliset yhdisteet voidaan ilmaista. MS:n liittäminen nestekromatografiaan vaatii erillisen liitännän, eli ionisointikammion, jossa liuotinmolekyylien ylimäärä voidaan poistaa ja näyte ionisoida (Ketola ym. 2010). Erilaisten LC-menetelmien soveltuvuus yhteen MS:n kanssa riippuu pääasiassa kolonnista sekä liikkuvan faasin ja tutkittavan yhdisteen fysikaalis-kemiallisesta luonteesta. Myös ajoliuosvalikoima on rajoittunut, koska haihtumattomat liuokset likaavat laitteen ja huonontavat herkkyyttä. Virtausnopeus ja injektioilavuus LC-MS:ssa määräytyvät käytettävän kolonnin ja ionisaatiotekniikan mukaan.

Fenolisten yhdisteiden määrittämisessä käytetään tavallisimmin ilmanpaineessa tapahtuvia ionisointimenetelmiä, joista yleisimmät ovat sähkösumutusionisaatio (ESI) ja ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (APCI) (Kammerer ym. 2012; Alarcón-Flores ym. 2014). Näistä ESI:a käytetään yleisemmin erilaisten fenolisten yhdisteiden ionisoimiseen, koska ESI:a voidaan käyttää sekä negatiivisessa että positiivisessa ionisoinnissa (Alarcón-Flores ym. 2014). Reagenssikaasuna ja verhokaasuna käytetään usein typpeä (N_2), koska ilman happi saattaa aiheuttaa ylimääräisiä hapetusreaktioita ja lisätä siten taustakohinaa (Ketola ym. 2010). Sähkösumutuksessa neste sumututaan pieniksi pisaroiksi korkean jännitteen ja sumutuskasun paineen avulla. ESI on erittäin pehmeä ionisointimenetelmä, jossa ionien sisäinen energia ei kasva eikä fragmentoitumista siten juurikaan tapahdu (Ketola ym. 2010). Pilkeioneja saadaan kuitenkin käyttämällä tandem-massaspektrometriaa (MS-MS tai MS^n).

Negatiivinen ionisointi tuottaa yleensä deprotonoituneita ioneja $[M-H]^-$ ja positiivinen ionisointi protonoituneita ioneja $[M+H]^+$ (Alarcón-Flores ym. 2014). Molempia ionisointitapoja käyttämällä saadaan määritettyä useampia fenolisia yhdisteitä kuin vain toista tapaa käyttämällä. Fenoliset yhdisteet ovat luonteeltaan happamia karboksyyli- tai OH-ryhmien ansiosta, minkä johdosta ne deprotonoituvat helposti (Kammerer ym. 2012). Antosyaaneilla on kuitenkin rakenteessaan positiivinen varaus, minkä johdosta antosyaanit suositellaan ionisoitavaksi positiivisella ja muut fenoliset yhdisteet negatiivisella

ionisoinnilla (Buendía ym. 2010; Kammerer ym. 2012; Álvarez-Fernández ym.2014). Ionisoinnin vaikutuksesta yhdisteet pilkkoutuvat. Fenolisten yhdisteiden ja etenkin flavonoidien (esim. flavonolit ja antosyaanit) pilkkoutuessa glykosidiset sidokset katkeavat useimmiten ensimmäisenä, mikä johtaa vetyatomien uudelleenjärjestäytymiseen ja sokerijäänteiden tai happojen irtoamiseen (Aaby ym. 2007a). Antosyaanien on havaittu ionisoituvan myös negatiivisella ionisoinnilla muodostaen $[M-2H]^-$ -ioneja, jolloin antosyaanin rakenteesta lohkeaa ensin positiivisesti varautunut protoni ($-H^+$) ja sen jälkeen vetyatomi ($-H$) (Jianghao ym. 2012). Kokonaisionivirran (TIC) monitoroinnilla täydellisestä massaspektrometristä voidaan määrittää myös ei-kohdennettuja yhdisteitä ja niiden molekyylipainoja sekä pyrkiä selvittämään yhdisteiden hajoamisreittejä tandem-massaspektrometrian avulla (Kammerer ym. 2012; Alarcón-Flores ym. 2014). TIC:n tietyn hetken intensiivisin ioni on yleensä molekyyli-ioni, mutta se saattaa olla myös taustakohinaa. Fenoliset yhdisteet tunnistetaan yleensä tunnettujen malliyhdisteiden retentioaikojen sekä massaspektrien ja pilkkoutumiskuvioiden perusteella.

Erilaisia fenolisten yhdisteiden määrittämiseen soveltuvia massaspektrometrilaitteita ovat esimerkiksi kvadrupolianalyysaattorit, ioniloukut, lentoaika-analyysaattori, Fourier-muunnos ionisyklotroniresonanssianalyysaattori sekä orbiloukkuanalyysaattori (Ketola ym. 2010). Orbiloukku on uusimmasta päästä massa-analyysaattoreita. Orbiloukku koostuu kahdesta samansuuntaisesta elektrodista. Se käyttää tasajännitteitä ionien manipulointiin ja itse analyysaattori toimii myös ilmaisimena, jolloin erillistä ilmaisinta ei tarvita. Ilmaiseminen ja massaspekttrin muodostus perustuu Fourier-muunnos-tekniikkaan. Orbiloukulla on kyky varastoida suurempia ionimääriä, mikä lisää herkkyyttä. Korkea resoluutio yhdistettynä suhteellisen yksinkertaiseen ja pienikokoiseen laitteistoon tekee siitä kilpailukykyisen vaihtoehdon.

2.6.3 Metabolomiikkatutkimukset

Metabolomi tarkoittaa biologisen organismin kaikkien aineenvaihduntatuotteiden eli geeni-ilmentymisen lopputuotteiden kokonaisuutta. Kasvien metabolomiikassa, eli metabolisessa profiloinnissa, tutkitaan solutoimintojen jättämiä kemiallisia sormenjälkiä järjestelmällisesti. Etenkin pienimolekyylisten ja sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden kirjoa tutkitaan mahdollisimman laajasti. Geeni-ilmentymistä koskevat tiedot ja proteomiikka-analyysit eivät välttämättä paljasta kaikkea solunsisäisistä tapahtumista, mutta metabolomiikka pystyy antamaan välittömän kuvan kyseisen solun fysiologiasta. Sekundääriset aineenvaihduntatuotteet, kuten fenoliset yhdisteet, säätelevät kasvin kehitystä ja kasvua sekä suojelevat kasvia ulkoisilta ympäristötekijöiltä.

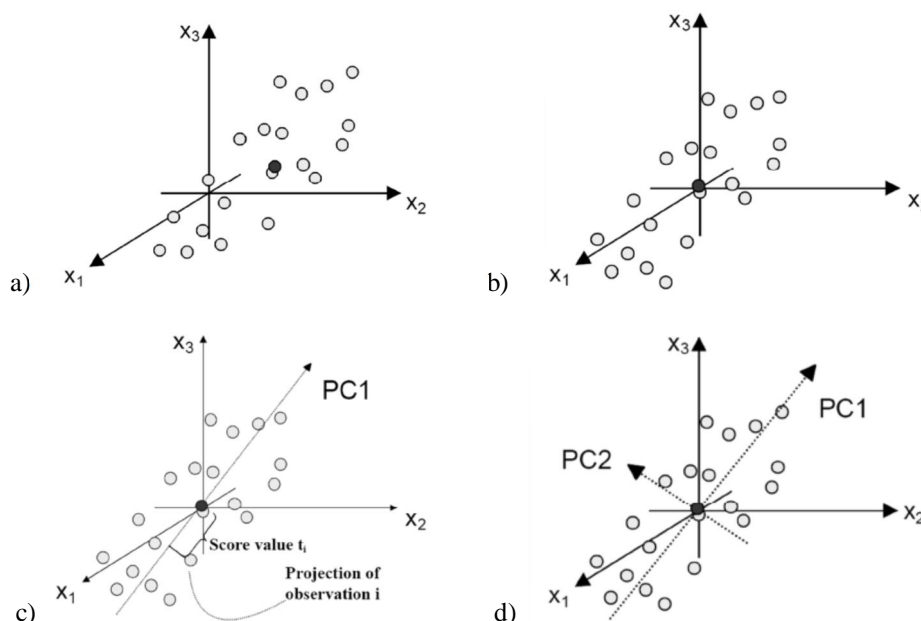
Metabolomiikan merkitys erilaisilla tieteenaloilla, muun muassa kemiassa, biokemiassa ja biologiassa, kasvaa koko ajan. Tutkimalla tiettyjen vihannesten, hedelmien ja marjojen aineenvaihduntatuotteita metabolomiikan keinoin saadaan pala kerrallaan selville erilaisten kasvien ja lajikkeiden ominaisuuksia ja eroavaisuuksia sekä tietoa kasvin laadusta, kasvuolojen vaikutuksesta ja kasveista tehdyistä tuotteista. Pedreschi ym. (2009) tutkivat metabolomiikan avulla päärynän ruskistumista ja sisuksen hajoamista aiheuttavia tekijöitä ja yhdisteitä GC-MS-menetelmällä. Tulosten perusteella sisuksen hajoamisreaktiot ja ruskistuminen olivat seurausta yhdisteiden hapettumis- ja pelkistymisreaktioista, jotka aiheutuivat liian alhaisesta happipitoisuudesta tai liian korkeasta hiilidioksidipitoisuudesta. Aprea ym. (2011) tutkivat puolestaan eri omenalajikkeiden haihtuvien yhdisteiden aineenvaihduntatuotteiden profiileja SPME-GC-MS-menetelmällä. Eri lajikkeiden aromikoostumuksissa havaittiin eroja ja tutkimuksessa löydettiin vain yksittäisille lajikkeille tyypillisiä yhdisteitä (kappale 2.3.1). Metabolomiikkaa voidaan hyödyntää myös elintarvikevääreännösten analytiikassa. Sen avulla pyritään määrittämään ja tunnistamaan mahdollisimman monta kohdematriisin yhdistettä, jolloin mukana havaittaisiin myös mahdolliset lisätyn raaka-aineen merkkiyhdisteet. Esimerkiksi Vaclavikin ym. (2012) tutkimuksessa kehitettiin kohdentamaton HPLC-MS-menetelmä määrittämään erilaisten appelsiini-, omena- ja greippimehujen aineenvaihduntatuotteiden profiileja. Menetelmällä havaittiin omena- tai greippimehun 15-prosenttinen lisäys appelsiinimehuun, joten menetelmä todettiin hyödylliseksi vääreännöksen testaamisessa.

2.6.4 Tilastolliset monimuuttujamenetelmät

Kemometriset tilastolliset monimuuttujamenetelmät ovat osoittautuneet varsin hyödyllisiksi työkaluiksi tulosten käsittelyssä esimerkiksi metabolomiikkatutkimuksissa, joissa tulokset voivat sisältää satoja käsiteltäviä yhdisteitä (Pedreschin ym. 2009; Aprea ym. 2011; Vaclavik ym. 2012). Monimuuttujamenetelmiä voidaan hyödyntää yhtälailla vääreännöstutkimuksissa kuin muunkin tyyppisissä tutkimuksissa (Saevels ym. 2004; Silva ym. 2006; Zhu ym. 2010; Wang ym. 2010; Zhang ym. 2011).

Kun tulosaaineistossa on enemmän kuin kuusi muuttujaa ($K \geq 6$), tulosten käsittelyyn voidaan käyttää monimuuttuja-aineiston tulosten tulkintaan soveltuvaa pääkomponenttianalyysia (PCA) (Eriksson ym. 2013). Analyysissä rinnakkaisnäytteitä nimitetään havaintotapauksina (N) ja esimerkiksi tutkittavia yhdisteitä muuttujina (K). PCA on laajaa tulosaaineistoa visuaalisesti kuvaileva malli, joka tuo uutta informaatiota vähentämällä moniulotteisuutta ja havainnollistamalla aineiston keskeisimpiä piirteitä. PCA:ssa muuttujista ($K_1, K_2, K_3 \dots$) muodostetaan uusia muuttujia ($PC_1, PC_2, PC_3 \dots$) ja

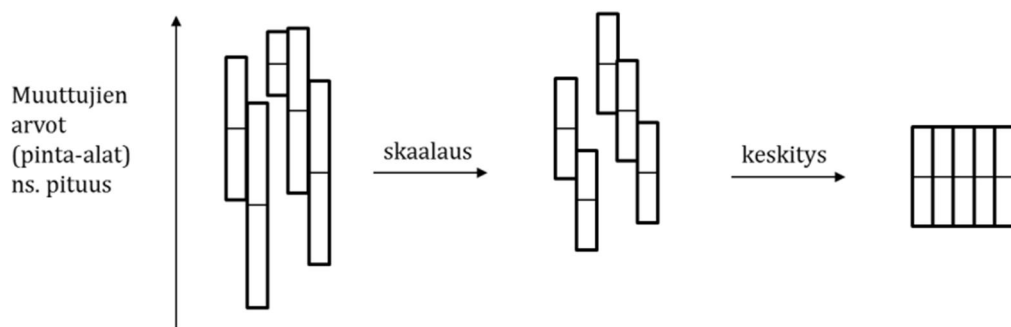
havainnot sijoitetaan kolmiulotteiseen avaruuteen (kuva 15a). Havaintojen keskipiste siirretään analyysissä nollaan (kuva 15b). Havaintomatriisia voi ajatella vaikka ranskanleipänä kolmiulotteisessa avaruudessa ja pääkomponentteja lineaarisina suorina havaintomatriisin läpi pituus- ja leveyssuunnassa. PCA maksimoi vertailtavien muuttujien välisen varianssin. Ensimmäinen pääkomponentti PC1 selittää suurimman osan muuttujien välisestä vaihtelusta (kuva 15c). PC2 puolestaan selittää seuraavaksi suurimman osan jäljellä olevasta vaihtelusta (kuva 15d) ja niin edelleen. PCA asettaa siis aineistomatriisin komponentit suuruusjärjestykseen ominaisarvojen (engl. eigenvalue) mukaan. PCA pelkistää alkuperäisen aineiston muutamaa selittävää tekijää ja helpottaa muuttujien ja havaintotapausten välisten vuorovaikutusten ymmärtämistä. PCA:n avulla moniulotteisesta tulosaineistosta voidaan löytää ne muuttujat, joiden avulla aineiston keskeisimmät piirteet voidaan esittää ilman, että merkittävää informaatiota menee hukkaan.



Kuva 15. Pääkomponenttianalyysin periaate (mukailtu lähteestä Eriksson ym. 2013). Tulosaineiston havaintotapaukset (N) sijoitetaan kolmiulotteiseen avaruuteen (a) ja keskitetään (kuvassa musta piste) (b). Ensimmäinen pääkomponentti PC1 selittää suurimman osan vertailtavien muuttujien välisestä kokonaisvaihtelusta (c). Toinen pääkomponentti PC2 puolestaan selittää seuraavaksi suurimman osan jäljellä olevasta vaihtelusta (d).

Ennen pääkomponenttianalyysiä aineistoa yleensä esikäsitellään. Yleisen menettelytapa on niin sanottu tulosaineiston autoskaalaus, jossa aineisto yksikkövarianssiskaalataan ja keskitetään (kuva 16) (Eriksson ym. 2013). Laskennalliset tietokoneohjelmat pystyvät suorittamaan autoskaalauksen PCA:n yhteydessä ennen varsinaista analyysiä. Kuvassa 16 muuttuja on sarake, joka voi sisältää erilaisia intensiteettejä. Muuttujien arvoa voi tässä kuvassa ajatella niin sanotusti pituutena. Skaalauksessa jokainen muuttuja saa varianssiksi 1, kun jokainen muuttuja jaetaan keskihajonnallaan. Jos arvoa ajatellaan pituutena, muuttujista tulee tällöin yhtä pitkiä. Lisäksi aineisto keskitetään, eli tällöin muuttujasta

vähennetään sen keskiarvo, toisin sanottuna aineisto nollakeskiarvoistetaan. Suurusluokalta hyvin erilaisista muuttujista saadaan siten vertailukelpoisia (intensiteetit voivat olla esimerkiksi 10 000 tai 1 000 000), koska jokainen muuttuja saa saman painoarvon. PCA:n suorittamisen jälkeen tulee suorittaa valinta siitä, mitkä komponentit voidaan hylätä vähämerkityksisinä, sillä menetelmä ei automaattisesti hylkää mitään komponentteja, vaan ainoastaan asettaa löytämänsä komponentit suuruusjärjestykseen.



Kuva 16. Tulosaineiston autoskalaus (mukailtu lähteestä Eriksson ym. 2013). Muuttuja on sarake, joka voi sisältää esimerkiksi erilaisia kromatogrammin piikin pinta-aloja eli intensiteettejä. Menettelyssä skaalatun muuttujan varianssiksi tulee 1 ja keskiarvoksi 0. Jos arvoa ajatellaan pituutena, muuttujista tulee tällöin yhtä pitkiä.

Pääkomponenttiregressio (PCR) suorittaa lisäksi PCA:ssa löytyneille pääkomponenteille moninkertaisen lineaarisen regressioanalyysin ja pyrkii löytämään korreloivat muuttujat (Eriksson ym. 2013). PCR-analyysissä oletuksena on X:n virheettömyys. Sen sijaan osittaisen pienimmän neliösumman malli (PLS) ei sisällä edellä esitetyistä analyysimalleista poiketen oletuksia X- tai Y-komponenttien virheettömyydestä. Muuttujia voi lisäksi olla enemmän kuin mittauksia, mikä rajoittaa esimerkiksi PCR-mallia. Mallin sovituksessa huomioidaan tulosten lisäksi kalibrointi-arvot ja tutkitaan niiden virhettä. PLS pyrkii maksimoimaan X- ja Y-muuttujien välisen lineaarisen korrelaation ja etsimään aineiston alta löytyvät piilomuuttujat, eli niin kutsutut latenttimuuttujat. Tarpeettomat muuttujat voidaan eliminoida analyysistä ja käsitellä vain haluttuja latenttimuuttujia regression avulla. PLS toimii aineistoa ennustavana mallina, kun taas osittaisen pienimmän neliösumman erotteleva menetelmä (PLS-DA) toimii aineistoa luokittelevana menetelmänä. PLS-DA:n luokittelu perustuu useiden PLS-luokkien erojen mallinnukseen.

2.7 YHTEENVETO

Marjahillot, -soseet ja -mehut ovat helppo väärentämisen kohde, sillä pääraaka-aine on jo tuotteen valmistuksessa muuttunut ja siten vaikeammin tunnistettavissa. Kasvitieteellisessä väärentämisessä tuotteen pääraaka-ainetta korvataan jollain halvemmalla raaka-aineella,

joka muistuttaa aistinvaraiselta laadultaan (haju, maku, koostumus ja väri) läheisesti alkuperäistä raaka-ainetta tai on muuten koostumukseltaan hyvin väritön ja mauton. Hillojen väärentämiseen käytettyjä hedelmiä ja vihanneksia voisivat olla esimerkiksi omena, päärynä ja kurpitsa. Mansikkahillo puolestaan on helppo kohde väärentämiselle, sillä mansikan voimakas aromi ja väri peittävät helposti miedomman hajuisen tai makuisen raaka-aineen lisäyksen.

Hilloväärennösten kiinnisaamiseksi on etsitty erilaisia analyttisiä keinoja tunnistaa väärennetty hedelmä- tai marjatuote aidosta tuotteesta. Väärennöksen havaitsemiseksi on oleellista tietää, mistä mahdollinen väärentävä raaka-aine koostuu ja millaisia kullekin kasville tyypillisiä merkkiyhdisteitä se sisältää. Lisäksi on tunnettava aidon tuotteen koostumus. Merkkiyhdisteinä on käytetty esimerkiksi kasveille tyypillisiä aromi- ja fenolihdisteiden profiileja. Omenan floritsiinia, päärynän arbutiinia ja kurpitsan syreeninihappoa on käytetty merkkiyhdisteinä hillojen väärennöstutkimuksissa. Mansikalle tyypillisiä aromiyhdisteitä ovat muun muassa furaneoli, mesifuraani, metyylibutanoaatti, etyylibutanoaatti ja etyyliheksanoaatti. Fenolisista yhdisteistä mansikalle tyypillisiä yhdisteitä ovat esimerkiksi (+)-katekiini ja pelargonidiini-3-glukosidi. Monenlaiset tekijät, kuten kasvin lajike, kypsyysaste sekä kasvuympäristö, voivat vaikuttaa kasvien merkkiyhdisteisiin. Tutkimalla tiettyjen vihannesten, hedelmien ja marjojen aineenvaihduntatuotteita metabolomiikan keinoin saadaan pala kerrallaan selville erilaisten kasvien ja lajikkeiden ominaisuuksia ja eroavaisuuksia sekä tietoa kasvin laadusta, kasvuolojen vaikutuksesta sekä kasveista tehdyistä tuotteista.

Kasvipohjaisten tuotteiden aitouden analytiikka on lähinnä kemiallista. Elintarvikkeiden aromiyhdisteitä voidaan määrittää esimerkiksi GC-menetelmillä. Mansikkatuotteiden ja mansikka-aromilla maustettujen elintarvikkeiden oikeellisuuden määrittämiseen on käytetty esimerkiksi SPME:a yhdistettynä GC-laitteistoon. Fenolisten yhdisteiden määrittämisessä näytteenkäsittely on useimmiten tärkein ja herkin vaihe niiden kemiallisen luonteen vuoksi ja erilaisia uuttomenetelmiä onkin tutkittu runsaasti. Fenolisten yhdisteiden yleisin määrittäystapa on HPLC-menetelmä. Ilmaisimena voidaan käyttää esimerkiksi UV/VIS- tai MS-ilmaisimia.

Kemometriset monimuuttujamenetelmät ovat osoittautuneet varsin hyödyllisiksi työkaluiksi tulosten käsittelyssä esimerkiksi metabolomiikkatutkimuksissa, joissa tulokset voivat sisältää satoja käsiteltäviä yhdisteitä. Niistä tyypillisin menetelmä on PCA ja sen johdokset.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 TYÖN TAUSTA JA TAVOITE

Kokeellisen työn tavoitteena oli selvittää, miten tutkimukseen valitut tekniikat soveltuvat mansikkahilloväärennösten tunnistamiseen, ja kehittää esikokeiden avulla alustava määrittämenetelmä Tullilaboratorion valvontakäyttöön hilloväärennösten havaitsemiseen. Tarkoitus oli luoda nopea ja yksinkertainen kvalitatiivinen menetelmä rutiinivalvonnan määrittäykseen, jolla voitaisiin luotettavasti todeta jos tuotteessa on jotain poikkeavaa. Tämän jälkeen kyseistä tuotetta voitaisiin tarkastella tarkemmin ja pyrkiä tunnistamaan, mitä väärentävää ainesosaa poikkeava tuote sisältää tai mitä se ei ainakaan sisällä.

Tutkimuksessa määritettiin kasveille ominaisia ja tyypillisiä haihtuvia aromiyhdisteitä ja haihtumattomia fenolisia yhdisteitä. Mansikkahillon aromiyhdisteiden määrittämiseen käytettiin SPME-GC-MS-menetelmää sekä fenolisten yhdisteiden määrittämiseen UHPLC-MS-menetelmää. Hilloksi keittämisen vaikutusta mansikan tyypillisiin yhdisteisiin tutkittiin tuoreen mansikkasoseen avulla.

Mansikkahillon väärentämiseen käytettyjä hedelmiä ja vihanneksia voivat olla esimerkiksi aistittavalta laadultaan miedomman makuisia ja hajuisia olevat omena, päärynä ja kurpitsa, joten kyseisillä tekniikoilla määritettiin myös omena-, päärynä- ja kurpitsahillojen aromi- ja fenoliyhdisteiden kokonaisprofiilit. Väärennösten havaitsemiskokeita varten tutkimuksessa tehtiin omia mansikkahilloväärennösseoksia omena-, päärynä- ja kurpitsahillojen kanssa suhteissa 5–50 %. Myös väärennösseosten aromi- ja fenoliyhdisteiden kokonaisprofiilit määritettiin. Kullekin kasville tyypillisten yhdisteiden avulla tutkittiin, kuinka hyvin niiden perusteella väärentävä ainesosa voitiin havaita mansikasta tehdyn hillon joukosta. Pyrkimyksenä oli luoda massakromatografisia profiileja eri tuotteista ja selvittää kuinka luotettavasti niitä, ja tutkimukseen valittuja tekniikoita, voidaan hyödyntää väärennösten havaitsemisessa.

Lisäksi tarkasteltiin menetelmien soveltuvuutta kaupallisten hillonäytteiden aitouden määrittämiseen, ja tarkasteltiin aromi- ja fenoliprofiilien vaihtelua näissä tuotteissa. Tulosten tarkastelussa käytettiin toistettavuuskokeita ja pääkomponenttianalyysia.

3.2 MATERIAALIT

3.2.1 Näytteet

Analysoitava näytemateriaali sisälsi yhdestä marjasta tai kasviksesta (mansikka, omena, päärynä ja kurpitsa) koostuvia itse tehtyjä hilloja ja soseita, laboratorioissa valmistettuja malliväärennöksiä sekä kaupallisia tuotteita (taulukko 1 ja liite 11). Näytemateriaalit hankittiin yleisimpien suomalaisten päivittäistavarakauppojen valikoimista pääasiassa tammikuussa 2015. Vuodenajasta johtuen mansikka hankittiin pakasteena ja omena, päärynä sekä kurpitsa hankittiin tuoreena. Itse tehtyjen näytehillojen raaka-aineiksi valittiin sellaisia tuotteita, joita oli vuodenaikaan saatavilla, joiden lajike oli tiedossa ja jotka olivat kilohinnaltaan halvimpia. Hillojen valmistus on kuvattu kappaleessa 3.3.1. Itse tehtyjä hilloja tehtiin 250–500 g yhtenä rinnakkaisena. Laboratorioissa valmistettiin mansikkahillo-malliväärennöksiä, joihin lisättiin väärentävää hilloa 5 %, 10 %, 20 % tai 50 %. Itse tehtyjen hilloväärennösten värieroja tarkasteltiin myös silmämääräisesti. Omena- ja päärynähilloit olivat väriltään hyvin vaalean ruskeita, kurpitsahillo puolestaan oranssinkeltainen. 5–20 % omenaa tai päärynää sisältäneitä mansikkahilloväärennöksiä ei silmämääräisesti pystynyt erottamaan puhtaasta mansikkahillosta. Myöskään 5 % kurpitsaa sisältänyt mansikkahilloväärennös ei erottunut mansikkahillosta. Yli 10 % lisäyksenä kurpitsa alkoi erottua pieninä kellertävinä paloina. Malliväärennökset, jotka sisälsivät 50 % omenaa tai päärynää olivat puolestaan väriltään hieman haaleampia ja harmaampia kuin mansikkahillo. 50 % kurpitsaa sisältäneen väärennöshillon väri oli vielä vaaleampi kuin omenan ja päärynän vastaavat seokset.

Taulukko 1. Tutkimuksen itse tehdyt näytteet. Hilloeriä tehtiin yksi rinnakkainen / näyte.

Puhtaat näytteet (soseet + hillot)	Lajike, alkuperä	Lisätietoja
Mansikka (<i>Fragaria x ananassa</i>) (sose + hillo)	Polka, Suomi	Pakaste. Kannaton suomalainen mansikka. Parasta ennen 12/2016.
Omena (<i>Malus domestica</i>) (hillo)	Ida Red, Puola	Tuore kilotavara.
Päärynä (<i>Pyrus communis</i>) (hillo)	Conference, Hollanti	Tuore kilotavara.
Kurpitsa (<i>Cucurbita moschata</i>) (hillo)	Butternutt, Portugali	Tuore kilotavara.
Malliväärennökset		
Mansikkahillo + omenahillo 5 %, 10 %, 20 % ja 50 % lisäyksenä		
Mansikkahillo + päärynähillo 5 %, 10 %, 20 % ja 50 % lisäyksenä		
Mansikkahillo + kurpitsahillo 5 %, 10 %, 20 % ja 50 % lisäyksenä		

Kaupalliset näytteet (17 kpl) valikoitiin päivittäistavarakauppojen eri merkeistä ja eri hintaluokista (liite 11). Jokaisesta tavaramerkistä ostettiin vain yksi rinnakkainen hillonäyte. Tuloksissa kaupalliset näytteet käsiteltiin satunnaisessa järjestyksessä olevina koodeina A–Q. Ainesosalistoja tarkasteltaessa havaittiin, että osa kaupallisista hilloista

sisälsi rypäle-, taateli- ja aroniamehutiivisteitä sekä lisättyä aromiyhdistettä. Vain kolmen tuotteen mansikoiden alkuperä oli tiedossa (Suomi, Puola ja Kiina). Kaupallisissa näytteissä käytettyjä mansikkalajikkeita ei saatu tietoon. Yksi tuotteista oli merkitty luomutuotteeksi. Soseet ja hillot säilytettiin +4 °C:ssa ja pakasteet -20 °C:ssa.

3.2.2 Reagenssit ja muut raaka-aineet

Työssä käytetyt reagenssit, liuottimet ja malliaineliuokset on koottu taulukkoon 2. Lisäksi työn suoritukseen tarvittiin hillosokeria (valmistaja: Dansukker, Suomi; ainesosat: sokeri, hyytelöimisaine (hedelmäpektiini), happamuudensäätöaine (sitruunahappo, sisältää 0,1 % kokonaan kovetettua kasvirasvaa (palmu)), säilöntäaine (kaliumsorbaatti); parasta ennen: 31.12.2016). Reagensseista valmistettiin lisäksi seuraavat liuokset:

- Malliaineiden kantaliuokset 100 mg/l metanolissa sekä 1000 mg/l Q-POD-vedessä. Laimennokset 10 mg/l metanolissa, lisäksi arbutiinista 10 mg/l 10-prosenttisessä metanolissa.
- 25-prosenttinen NaCl-liuos Milli-Q-vedessä
- 70-prosenttinen asetoni Q-POD-vedessä
- 20-prosenttinen metanoli Q-POD-vedessä (Metanolin ja veden eksotermisestä reaktiosta johtuen liuos lämpenee valmistettaessa, joten liuos valmistettiin vähintään edellisenä päivänä ennen käyttöä. Tällöin liuos oli käytettäessä huoneenlämpöistä ja liuostilavuus pysyi toistettavana.)
- UHPLC-MS-ajoliuos A: 1-prosenttinen HCOOH Q-POD-vedessä
- UHPLC-MS-ajoliuos B: 1-prosenttinen HCOOH asetonitrilissä

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen reagenssien, liuottimien ja malliaineiden CAS-numerot, valmistajat, puhtausasteet, erätunnisteet sekä erän käyttöönottopäivämäärä.

Reagenssit ja malliaineet	CAS-numero	Valmistaja	Puhtausaste	Erätunniste	Avattu
Arbutiini (C ₁₂ H ₁₆ O ₇)	497-76-7	HWI Analytik GmbH, Saksa	88,77 %	LOT: HWI00073	20.1.2015
Asetoni (CH ₃ COCH ₃)	67-64-1	VWR International, Yhdysvallat	99,7 % 0,2 µm	LOT: 14Z3453 LOT: 14Z3465	ei tiedossa 9.3.2015
Asetonitriili, ACN (CH ₃ CN)	75-05-8	VWR International, Yhdysvallat	99,9 % LC-MS	LOT: 14Z2710 LOT: 14Z2997	6.11.2014 4.6.2015
Floritsiinidihydraatti (C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀ · 2 H ₂ O)	7061-54-3	Sigma-Aldrich, Yhdysvallat	99 %	LOT: SLBF219V	20.1.2015
Metanoli, MeOH (CH ₃ OH)	67-56-1	Sigma-Aldrich, Yhdysvallat	≥ 99 % HPLC	LOT: SZBE170SV	20.1.2015
Metanoli, MeOH (CH ₃ OH)	67-56-1	Sigma-Aldrich, Yhdysvallat	≥ 99,9 % LC-MS	LOT: SZBE215BV	ei tiedossa
Milli-Q-vesi			0,4 µm		
Muurahaishappo (HCOOH)	64-18-6	Sigma-Aldrich, Yhdysvallat	~ 98 % LC-MS	LOT: BCBM1192V LOT: BCBN2977V	1.12.2014 22.5.2015
Natriumbentsoaatti (C ₆ H ₅ COONa)	532-32-1	Sigma-Aldrich, Yhdysvallat	≥ 99 %	LOT: 1351586 23408014	5.2.2009
Natriumkloridi (NaCl)	7647-14-5	VWR International, Yhdysvallat	99,99 %	LOT: 14D150019 LOT: 14D150019	16.2.2015 5.5.2015
Q-POD-vesi			0,2 µm LC-MS		

3.2.3 Laitteet ja välineet

Tässä luvussa on listattuna kaikki tutkimuksessa käytetyt laitteet ja välineet. Laitteet ja välineet listattiin erikseen SPME-GC-MS-menetelmälle ja UHPLC-MS-menetelmälle.

SPME-GC-MS-laitteisto ja -menetelmän välineet

- 6890N Network GC System (Agilent Technologies, Yhdysvallat)
- 5973 Network Massaselektiivinen detektori (Agilent Technologies, Yhdysvallat)
- MSD ChemStation E.02.01.1177 (Agilent Technologies, Yhdysvallat)
- NIST Mass Spectral Search Program 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Yhdysvallat)
- Wiley Registry of Mass Spectral Data (John Wiley & Sons, Yhdysvallat)
- Kolonni: HP-5ms Ultra Inert (5-prosenttinen fenyyli)-metyylipolysiloksaani 30 m x 0,25 mm, filmin paksuus 0,25 µm (Agilent Technologies, Yhdysvallat)
- Pulssitettu suora höyrystävä injektointi (pulsed splitless), tuloaukon tiiviste (inlet liner) 5181–3316 1,8 mm (Agilent Technologies, Yhdysvallat)
- Manuaaliseen injektointiin soveltuva SPME-kuitupidike (Supelco, Yhdysvallat)
- 100 µm:n PDMS-kuitu (57300-U, LOT: KFU01A) (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat)
- 75 µm:n CAR-PDMS-kuitu (57344-U, LOT: 50678) (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat)
- 20 ml:n ilmatiiviitä ampulleja
- Muovisia pasteur-pipettejä, joista kärki leikattu
- Magneetteja
- Vortex-sekoitin (Genie II Vortex Mixer)
- Lämmittävä magneettisekoittaja (Variomag ® Monotherm)

UHPLC-MS-laitteisto ja -menetelmän välineet

- UHPLC Ultimate 30000 (Thermo Fischer Scientific, Yhdysvallat), jossa nelikanavainen UV-detektori
- LTQ-Orbitrap Elite ETD (Thermo Fischer Scientific, Yhdysvallat)
- Thermo Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fischer Scientific, Yhdysvallat)
- Kolonni: Acquity UPLC® BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18 (2,1 mm x 100 mm, partikkelikoko 1,7 µm) (LOT: 0248343211) (Waters Corporation, Yhdysvallat)
- Hienonnuksen homogenisaattori (Polytron ® PT 3000 Kinematica AG, terä PT-DA 3012 / 2 T)
- Ultraäänihaude (FinnSonic m03)
- Jäähdyttävä sentrifuugi (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- Pyörähaihduttaja (Laborota 4000 Heidolph Instrument), vakuumpumppu (PIAB Lab Vac H40)
- Typpihaihdutin (Zymark Turbovap II) ja haihdutusputket (Zymark)
- 50 ml sentrifugointiputket (Sarstedt)
- 250 ml lasiset pyörökolvit
- kalvoruiskusuodattimet (PALL Acrodisc 0,2 µm), 5 ml ruiskut
- 2 ml kierrekorkilliset ampullit

Muut laitteet ja välineet

Työn eri vaiheissa käytettiin laboratorioden yleisimpien välineiden lisäksi seuraavia laitteita, välineitä sekä ohjelmia:

- Analyysiväät (Presica XT 320M, Presica 300 C-3000 ja Shimadzu 77BL2200H)
- Sauvasekoitin (Bamix 200)
- Homogenisaattorit (Retsch Grindomix GM 200 ja Robot coupe Blixer 6 v.v)
- Homogenointivälineiden pesuun käytettiin 70 % etanolia
- Kannelliset lasipurkit hilloja varten (395 ml ja 1000 ml)
- Tulosten käsittely ja tilastolliset analyysit tehtiin Microsoft Officen Excel 2010 - ja Camon The Unscrambler X 10.1 -ohjelmistoilla.

3.3 MENETELMÄT

3.3.1 Näytteiden esikäsittely ja hillojen valmistus

Mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsanäytteiden syötävän osan homogenointi suoritettiin sauvasekoittimella tai isommalla homogenisaattorilla näyte-erän koosta tai raaka-aineen kovuudesta riippuen. Pakasteena olleiden mansikoiden annettiin sulaa huoneenlämmössä noin tunnin ennen homogenointia. 500 g mansikan homogenoidusta näytteestä jätettiin tuoreeksi soseeksi ja mukaan lisättiin 0,4 g natriumbentsoaattia säilöntäaineeksi. Tuoresose siirrettiin sellaisenaan SPME-GC-MS- ja UHPLC-MS-tekniikoiden esikäsittelyyn (ks. 3.3.2.1 ja 3.3.3.1).

Muista näytteistä tehtiin hilloja homogenoinnin jälkeen. Hillon valmistuksen ohje oli mukailtu hillosokeripaketin sekä lähteiden Lesschaeve ym. (1991), Patras ym. (2011) ja Mazur ym. (2014) ohjeista. 500 g hilloa valmistettiin seuraavalla tavalla. Noin 250 g homogenoitua näytettä punnittiin kattilaan ja joukkoon lisättiin 125 ml vesijohtovettä. Seos kuumennettiin noin 85 °C:een, jonka jälkeen lisättiin 250 g hillosokeria. Hilloa sekoitettiin ja sen annettiin kiehua hiljalleen noin 10 minuuttia. Tämän jälkeen kattila otettiin pois liedeltä ja lisättiin 0,25 g natriumbentsoaattia. Hilloa ei kuumennettu enää säilöntäaineen sekoituksen jälkeen. Hillo kaadettiin lasipurkkiin, jossa oli metallinen kierrekansi. Hillon annettiin jäähtyä huoneenlämmössä noin tunnin ajan, jonka jälkeen hilloa säilytettiin jääkaapissa (4 °C). Natriumbentsoatin lisäys hillojen säilöntäaineeksi tehtiin Eviran marjavalmistekoostumusohjeen enimmäismäärän mukaisesti. Enimmäismäärä bentsoehapolle (E210–E213) on 500 mg/kg (Evira ohje/versio 17021/2, 2009). Tuoresoseeseen natriumbentsoaattia lisättiin säilyvyyden parantamiseksi enemmän kuin hilloihin, koska hillojen hillosokerissa itsessään oli mukana toinen lisätty säilöntäaine kaliumsorbaatti.

Malliväärennökset tehtiin sekoittamalla valmiita hilloja halutuissa suhteissa (taulukko 3). Taulukossa 3 esimerkkinä on mansikkahillon ja omenahillon sekoitussuhteet. Päärynän ja kurpitsan malliväärennökset tehtiin vastaavalla tavalla. Lisäksi tehtiin saantokoenäyte, josta on kerrottu tarkemmin kappaleessa 3.3.5.

Taulukko 3. Mansikkahillot, joihin lisättiin 5 %, 10 %, 20 % tai 50 % omenahilloa. Kutakin hilloa tehtiin 250 g.

Seos ja suhde (kutakin hilloa 250 g)	Mansikka- hillo (g)	Omena- hillo (g)
Mansikka + omena 5 %	237,5	12,5
Mansikka + omena 10 %	225	25
Mansikka + omena 20 %	200	50
Mansikka + omena 50 %	125	125

3.3.2 SPME-GC-MS

Haihtuvat aromiyhdisteet uutettiin näytteen ilmatilasta manuaalisella SPME:lla ja määritettiin GC-MS-menetelmällä. Kaikki näytteet (yhteensä 35 kpl) määritettiin kolmena rinnakkaisena näytteenä.

3.3.2.1 SPME-esikokeet ja aromiyhdisteiden uutto

Työssä vertailtiin aromiyhdisteiden uuttumista kahdella erilaisella SPME-kuidulla. Vertailtavat kuidut olivat 100 µm:n PDMS-kuitu ja 75 µm:n CAR-PDMS-kuitu. Ennen uuttoja SPME-kuitujen kunnostus suoritettiin valmistajan suosituksen mukaisesti (PDMS: 30 min, 250 °C; CAR-PDMS: 1 tunti, 300 °C). Näytematriisina vertailussa käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. 75 µm:n CAR-PDMS-kuidulla isokokoisten ja myöhemmin retentoituvien yhdisteiden uuttuminen ei onnistunut yhtä hyvin kuin 100 µm:n PDMS-kuidulla. Esimerkiksi E-nerolidolia, joka on yksi mansikan tyypillisistä ja voimakkaasti esiintyvistä aromiyhdisteistä, ei havaittu käytettäessä 75 µm:n CAR-PDMS-kuitua. Siten kuiduista käyttöön valittiin 100 µm:n PDMS-kuitu, jota käytettiin muissa määrittelyissä.

Kuitu puhdistettiin jokaisen uuttopäivän aluksi injektoimalla kuitu tyhjänä GC-MS-määrittelyohjelmalla (2 min pito GC-injektioportissa). Häiriöpiikkejä näkyi kuitenkin jatkuvasti kromatogrammeissa, mutta tätä ei manuaalisessa injektoinnissa voitu täysin estää. Kuitu säilytettiin uuttojen välillä tyhjässä autoklavoidussa ilmatiiviissä ampullissa. Lisäksi kuitu vaihdettiin uuteen, kun sillä oli tehty noin 60 uuttoa ja GC-määrittystä. Valmistajan mukaan kuitu kestää keskimäärin noin 50–100 uuttoa ja GC-määrittystä. Uusi kuitu kunnostettiin ohjeen mukaisesti ja lisäksi uudella kuidulla määritettiin aina viimeisimpänä vanhalla kuidulla määritetty näyte, että varmistettiin kuitujen yhdenmukainen toimivuus.

SPME:n esikäsittelyvaiheita muokattiin tulosten perusteella ja vakioitiin lopullinen toimintatapa. Pohjana käytettiin Reidin ym. (2004) kehittämää menetelmää. 8 g näytettä punnittiin 20 ml:n ampulliin. Punnituksen havaittiin onnistuvan parhaiten muovisella pasteuripipetillä, josta terävin kärki oli leikattu. Ampulliin lisättiin magneetti ja 2 ml:aa 25-prosenttista NaCl-liuosta ja korkki suljettiin ilmatiiviisti. NaCl-liuosta lisättiin näytteisiin edesauttamaan haihtuvien yhdisteiden siirtymistä ilmatilaan, eli ulossuolausta (De Boishebert ym. 2006; Ravid ym. 2009; Schillipiti ym. 2011). Ampullia sekoitettiin noin 10 sekuntia Vortexilla.

Esikokeiden perusteella näyteampullin ilmatilan tasapainottuminen SPME-kuidun kanssa voitiin aloittaa heti, kun ampulli siirrettiin lämmittävälle magneettisekoittajalle, eli erillistä ilmatilan tasapainottumisaikaa ennen uuttoja ei tarvittu. Ampullin korkkiin tehtiin reikä kuitua varten ja kuitu asetettiin ampulliin noin 1 cm nestepinnan yläpuolelle keskelle ampullia. Näytteen ollessa paksumpaa (esim. kurpitsahillo) oli käytettävä isompaa magneettia, jolloin kuitu asetettiin ampullissa ylemmäs noin 2 cm:n korkeudelle nestepinnasta heti korkin alapuolelle. Ilmatilan osuus ampullista oli noin puolet. Aromiyhdisteiden uuttoaika kuidun kanssa oli 30 min. Uuton aikana ilmatilan ja kuidun välille muodostui uusi tasapainotila. Hilloseosta sekoitettiin lämmittävällä magneettisekoittajalla koko uuttumisen ja tasapainottumisen ajan (50 °C, noin 450–500/kierrosta minuutissa). Uuttamisen jälkeen aromiyhdisteet vapautettiin pitämällä kuitua 2 minuuttia GC-injektioportissa.

Koska injektointi tehtiin manuaalisesti, rinnakkaiset näytteet oli tehtävä peräkkäisenä sarjana. Valmiiksi ampulleihin punnitut ja korkilla suljetut näytteet säilytettiin jääkaapissa (4 °C) sillä aikaa, kun yhden rinnakkaisen näytteen uutto kuidun kanssa oli käynnissä.

3.3.2.2 GC-MS-esikokeet ja aromiyhdisteiden määrittäminen

Aromiyhdisteiden GC-MS-määrittäminen tehtiin aina samana päivänä kuin SPME. Työssä käytettiin HP-5ms-kolonnaa. GC-MS-määrittämiseksi testattiin viittä erilaista kolonniuunin lämpötilaohjelmaa muun muassa eri lähteiden pohjalta (taulukko 4). Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. Ensimmäisenä testattu Reidin ym. (2004) tutkimuksessa käytetty aloituslämpötila ja gradientti havaittiin parhaiksi. Yhdisteiden erottuminen ei muuttunut merkittävästi gradientin muutosten myötä, mikä oli alun perin syy testata erilaisia lämpötilaohjelmia.

Taulukko 4. Tutkimuksen esikokeissa testatut kaasukromatografian lämpötilagradientit.

Gradientti	Lämpötilaohjelma	Kokonais- ajoaika	Huom	Lähde
1	Aloitustempötila 40 °C (pito 1 min) → nosto 280 °C:een 10 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 10 minuuttia	35 min		Reid ym. 2004
2	Aloitustempötila 40 °C (pito 3 min) → nosto 60 °C:een 2 °C/minuutissa → nosto 130 °C:een 10 °C/minuutissa → pito 130 °C:ssa 8 minuuttia → nosto 280 °C:een 20 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 1,5 minuuttia	37 min	Hitaampi lämpötilan nosto	De Boisherebert ym. 2006
3	Aloitustempötila 40 °C → nosto 190 °C:een 5 °C/minuutissa → nosto 280 °C:een 10 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 2 minuuttia, kokonaisajoaika 44 min	44 min	Hitaampi lämpötilan nosto	Reid ym. 2004 ja Schipilliti ym. 2011
4	Aloitustempötila 40 °C → nosto 190 °C:een 15 °C/minuutissa → nosto 280 °C:een 20 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 2 minuuttia	16,5 min	Nopeampi lämpötilan nosto	-
5	Aloitustempötila 35 °C (pito 3 min) → nosto 280 °C:een 10 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 2 minuuttia	29,5 min	Alhaisempi aloitustempötila 35 °C	-

Näyttemäärittelyksissä käytetty lämpötilaohjelma oli seuraavanlainen: aloitustempötila 40 °C (pito 2 min) → nosto 280 °C:een 10 °C/minuutissa → pito 280 °C:ssa 2 minuuttia, kokonaisajoaika 28 min. Erona Reidin ym. (2004) tutkimukseen nähden pitoaikaa 280 °C:ssa ajo-ohjelman lopussa lyhennettiin 10 minuutista 2 minuuttiin, koska aromiyhdisteet eluoituivat jo huomattavasti aiemmin. Kantokaasuna GC-määrittelyksissä oli helium. Näytteet elektroni-ionisoitiin 70 eV:lla. Näytteiden aromiyhdisteet määritettiin kokonaisonivirrasta skannausalueella m/z 25–650 ja signaalit kerättiin MS-ilmaisimelta (threshold 150, intensiteetti > 1000).

3.3.2.3 Tulosten käsittely

Kromatogrammin signaalipiikit integroitiin manuaalisesti ja intensiteetit taulukoitiin Excel-taulukkoon. Tulosaieisto järjestettiin sarakkeittain retentioajan mukaan. Ensin luokiteltiin kolme rinnakkaista näytettä, joista otettiin keskiarvo. Aineistosta poistettiin sellaiset yhdisteet, jotka esiintyivät vaan yhdessä rinnakkaisessa näytteessä. Seuraavassa vaiheessa eri näytteiden yhdisteet luokiteltiin sarakkeisiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvoja käyttäen. Aromiaineiston luokittelu käytiin kaksi kertaa läpi.

Aluksi retentioaikaliukumana pidettiin noin 0,03 minuuttia, mutta tämä osoittautui liian kapeaksi aikaväliksi. Normaaliksi retentioaikavaihteluksi tulkittiin myöhemmin 0,01–0,09 min, eli keskimäärin noin 0,05 min. Muutamalla yhdisteellä liukuma oli poikkeuksellisesti myös yli 0,10 min. Vahvan tunnistuksen perusteella (esim. oktaanihappo) sama yhdiste saattoi retentoitua eri näytteissä jopa 0,20 min erillään toisistaan.

Yhdisteiden luokittelussa välttämättömänä työkaluna käytettiin myös yhdisteiden spektrejä, sillä kahdella erillisellä yhdisteellä saattoi olla myös sama retentioaika samassa ajossa: esimerkiksi heksyylibutanoaatti eluoitui päällekkäin bentsoehapon ja α -muuroleeni α -farneseenin kanssa. Yhdisteiden tunnistuksessa käytettiin apuna NIST- ja Wiley-spektritietokantoja sekä muuta kirjallisuutta (liitteet 1, 3, 5 ja 6; Maarse 1977; De Boishbert 2006; Hakala 2002; Schipilliti 2011; Schwieterman 2014). Itse tehdyistä mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillonäytteistä tunnistettujen yhdisteiden tiedot kerättiin ylös (mm. retentioaika, nimi ja CAS-nro). Yhdisteiden joukosta pyrittiin tunnistamaan kullekin kasville tyypilliset yhdisteet sekä häiriösignaaleja aiheuttaneet yhdisteet.

Kromatogrammin piikkien integroinnissa kaikki piikit integroitiin, myös tietävästi SPME-kuidusta tai laboratorioilmasta aiheutuneet häiriöpiikit. Tällä tavoin saatiin selville, kuinka paljon integrointitapa tuottaa häiriöitä tulosten PCA:han vai olivatko nämä häiriöpiikit intensiteetiltä niin pieniä etteivät vaikuttaneet tulosten tulkintaan. PCA:ssa samaksi yhdisteeksi luokiteltiin vain retentiovälillä 0,01–0,09 min olleet yhdisteet ja eri yhdisteiksi luokiteltiin kauempana toisistaan olleet yhdisteet, vaikka spektrin tunnistuksen perusteella olisi ollut toisinpäin. Poikkeuksena edelliseen hillojen säilöntäaineista (sorbiinihappo ja bentsoehappo) aiheutuneet signaalipiikit jätettiin kuitenkin huomioimatta integroinnissa ja tulosten PCA:ssa, sillä yhdisteet olivat näytteisiin lisättyjä yhdisteitä ja selkeästi tunnistettavissa.

3.3.3 UHPLC-MS

Haihtumattomien fenolisten yhdisteiden määrittäminen tehtiin uuton jälkeen UHPLC-MS-tekniikkaa käyttäen. Ennen näyteajoja malliaineet määritettiin liuoksina (10 mg/l floritsiinia metanolissa ja 10 mg/l arbutiinia 10-prosenttisessa metanolissa). Malliaineyhdisteiden retentioajat ja MS-pilkkoutuminen selvitettiin. Kaikki näytteet (yhteensä 35 kpl) määritettiin kolmena rinnakkaisena näytteenä.

Fenoliset yhdisteet tunnistetaan yleensä tunnettujen malliyhdisteiden retentioaikojen sekä MS-spektrien ja pilkkoutumiskuvioiden perusteella. Massaspektrometriset määritykset tehtiin LTQ-Orbitrap-laitteiston kvadrupoli-ioniloukkulla, sillä tässä työssä ei ollut tarvetta määrittää yhdisteiden tarkkaa massaa. Lisäksi ioniloukun kalibrointi säilyi orbiloukkua pidempään tasaisena, joten määrittäminen ioniloukkulla oli käytön kannalta nopeampaa.

3.3.3.1 Uuttomenetelmien esikokeet ja valinta

Tutkimuksessa testattiin kahta erilaista uuttomenetelmää: perinteistä kiinteä-nesteuuttoa ja ultraääniuuttoa, joiden tavoitteena oli uuttaa fenolisia yhdisteitä näytteestä mahdollisimman monipuolisesti. Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa.

Seuraava kiinteä-nesteuutto menetelmä sovellettiin Malmbergin (2010) tutkimuksesta. 3 g hilloa punnittiin sentrifugointiputkeen. Putkeen lisättiin 20 ml 70-prosenttista asetonia, jonka jälkeen näytettä hienonnettiin noin 30 sekunnin ajan Polytron-homogenisaattorilla. Mikäli mahdollista, näytteen pitäminen jäässä oli suositeltavaa fenolisten yhdisteiden säilymisen parantamiseksi. Homogenoitu näyte sentrifugoitiin (3500 rpm, 15 min 4 °C:ssa). Kirkas supernatantti pipetoitiin pyörökolviin (250 ml). Sentrifugointiputkeen lisättiin jälleen 20 ml 70-prosenttista asetonia, jonka jälkeen näyte hienonnettiin ja sentrifugoitiin uudelleen. Supernatantti siirrettiin kolviin ja yhdistetyt uutteen haihdutettiin lähes kuiviin pyöröhaihduttimella (vakuumipumpun paine noin 800 mbar ja kolvin kierrosnopeus noin 110 rpm). Vesihauteen lämpötila pidettiin koko ajan alle 35 °C:ssa. Kun jäännöstä oli jäljellä noin 15 ml, haihdutettiin jäljellä oleva asetoni pois Zymarkin typpihaihduttimella (noin 1 tunti 34 °C:ssa, paine 1 bar). Jäännös pipetoitiin 10 ml:n mittapulloon ja pullo täytettiin merkkiin 20-prosenttisella metanolilla.

Ultraääniuutto oli kiinteä-nesteuuttoa nopeampi ja yksinkertaisempi menetelmä sekä sen avulla fenolisia yhdisteitä uuttui monipuolisemmin kuin kiinteä-nesteuutolla. Ultraääniuuttoa käytettiin siten tutkimuksen näytteiden fenolisten yhdisteiden uuttamiseen. Käytetty ultraääniuutto oli sovellus Aabyin ym. (2007 ja 2012) tutkimuksissa käytetyistä menettelyistä. Sentrifugointiputkeen punnittiin 5 g näytettä, johon lisättiin 10 ml asetonia. Näytettä hienonnettiin sen jälkeen noin 30 sekunnin ajan Polytron-homogenisaattorilla. Homogenoitua näytettä uutettiin 10 minuutin ajan ultraäänihauteessa (lämpötila < 35 °C). Ultraäänihauteen jälkeen näyte sentrifugoitiin (1500 g, 10 min 4 °C:ssa). Kirkas supernatantti kerättiin talteen typpihaihdutusputkeen. Liukenemattomaan näytemateriaaliin lisättiin 10 ml 70-prosenttista asetonia ja ravisteltiin kevyesti siten, että sakka hajosi ja sekoittui liuottimen kanssa. Näyte uutettiin uudelleen ultraäänihauteessa ja sentrifugointi toistettiin. Supernatantit yhdistettiin ja asetoni haihdutettiin Zymarkin typpihaihduttimella (noin 1 tunti 34 °C:ssa, paine 1 bar). Jäännös pipetoitiin 10 ml:n mittapulloon ja pullo täytettiin merkkiin 20-prosenttisella metanolilla.

3.3.3.2 UHPLC-MS-esikokeet ja fenolisten yhdisteiden määrittäminen

Näyteuutteet suodatettiin (0,2 µm) näyteampulleihin UHPLC-MS-määrittämistä varten. Näytteiden automaattisen näytteensyöttäjän lämpötila ajojen aikana oli 18 °C, muulloin näyteampullit pidettiin jääkaapissa 4 °C:ssa. Ajot tehtiin pääasiassa joko samana päivänä uuttojen kanssa tai korkeintaan 1–2 päivää uuton jälkeen. Ennen näyteajoja laitteistolla tehtiin niin sanottu tasapainotusajo esimerkiksi vanhalla näytteellä. Vaihtoehtoisesti ajosarjan ensimmäinen ajo uusittiin ajo-olosuhteiden tasapainottumiseksi.

Näytteen injektioilavuus oli 5 µl. Työssä käytetty kolonni oli Acquity UPLC® BEH C18-kolonni (2,1 mm, 100 mm, partikkelikoko 1,7 µm). Kolonniuunin lämpötilaksi säädettiin 30 °C. Ajoliuoksina käytettiin Aaby (2012) ym. tutkimuksen perusteella 1-prosenttinen HCOOH vedessä (A) ja 1-prosenttinen HCOOH asetonitrilissä (B). Ajoliuoksen virtausnopeus pidettiin 0,2 ml/minuutissa gradienttia käyttäen (taulukko 5). Ajo-ohjelman kesto oli 30 min, josta 25 min oli massaspektrometrin mittausta, jonka jälkeen oli 5 min kolonnin tasapainottumista takaisin lähtötilanteeseen. Laitteiston painetta seurattiin näyteajojen aikana olosuhteiden tasalaatuisuuden varmistamiseksi. Lisäksi käytössä oli UHPLC-laitteiston nelikanavainen UV-ilmaisim. Yhdisteiden ionisoimiseen käytettiin ESI:a. Ionisoinnin parametrit on lueteltu taulukossa 6. Verhokaasuna käytettiin typpeä (N₂).

Taulukko 5. UHPLC-ajoliuosten gradientti. A: 1-prosenttinen HCOOH vedessä, ajoliuos B: 1-prosenttinen HCOOH asetonitrilissä.

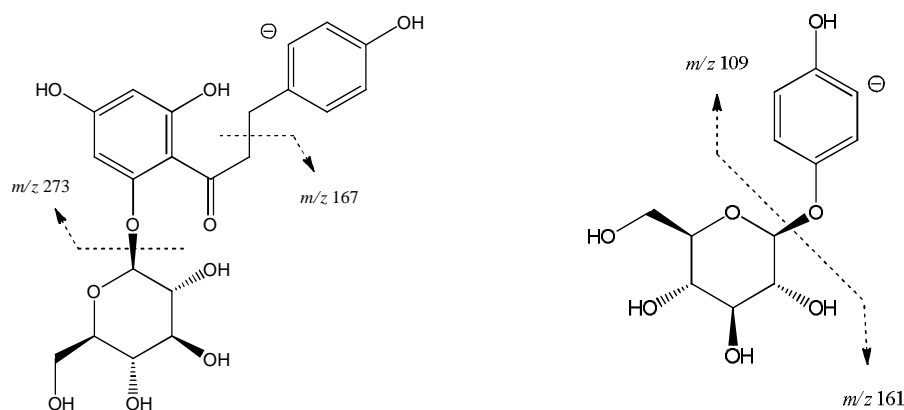
Aika (min)	% A	% B	paine keskimäärin (bar)
0	90	10	260–300
20	0	100	120
20–25	0	100	120
25–30	90	10	260–300

Taulukko 6. Massaspektrometrin ionisoinnin (Heated ESI Source) parametrit.

Sähkösumutusionisointijännite (I Spray Voltage) (kV)	3,2
Suihkutusvakio (Spray Current) (µA)	1
Jännitelähteen lämpötila (Source Heater) (°C)	300
Verhokaasun nopeus (Sheat Gas Flow rate) (arb)	35
Apukaasun nopeus (Aux Gas Flow rate) (arb)	10
Pyyhkäisykaasun nopeus (Sweep Gas Flow rate) (arb)	0
Kapillaarilämpötila (Capillary Temp) (°C)	350

UHPLC-MS-menetelmää testattiin ja kehitettiin malliaineiden (floritsiini ja arbutiini) sekä itse tehdyn mansikkahillonäytteen avulla. Tutkimuksessa testattiin sekä positiivista että negatiivista ionisointia. Floritsiinia (10 mg/l metanolissa) ei kuitenkaan havaittu positiivisella ionisoinnilla, joten positiivista ionisointia ei testattu myöskään arbutiinille.

Floritsiinin deprotonoitunut molekyyli-ioni $[M-H]^-$, jonka m/z -suhde oli 435 ja retentioaika n. 6,18, havaittiin negatiivisella ionisoinnilla sekä UV-VIS-ilmaisimella aallonpituudella 280 nm. Floritsiinin MS^2 -lohkeaman (m/z 273) pääteltiin aiheutuvan floritsiinin aglykoni-osasta (florektiini) ja MS^3 -lohkeaman (m/z 167) fenoli-osasta (kuva 17). Arbutiinia (10 mg/l metanolissa) ei havaittu ollenkaan negatiivisella ionisoinnilla, joten arbutiinista tehtiin uusi liuos (10 mg/l) 10-prosenttissa metanolissa. Tällöin arbutiini muodosti ajoliuoksen muurahaishapon kanssa vahvan addukti-ionin $[M+HCOOH-H]^-$, jonka m/z -suhde oli 317 ja retentioaika n. 1,73. Samalla retentioajalla havaittiin myös deprotonoitunut $[M-H]^-$ -ioni, jonka m/z -suhde oli 271. m/z 271 -ioni löytyi myös valitun ionin kromatogrammista (engl. extracted ion chromatogram). Arbutiinin m/z 271 -ionin MS^2 -lohkeamien m/z -suhteet olivat 161 ja 109 (kuva 17).



Kuva 17. Floritsiinin m/z 435 -ionin (vas.) ja arbutiinin m/z 271 -ionin (oik.) pilkkoutuminen negatiivisella sähkösumutusionisoinnilla.

Itse tehdystä mansikkahillosta tehtiin näytemäärytykset sekä positiivisella että negatiivisella ionisoinnilla. Negatiivisella ionisoinnilla havaittiin enemmän yhdisteitä, sillä myös antosyaanien havaittiin ionisoituvan negatiivisena muodossa $[M-2H]^-$. Antosyaanien havaittiin muodostavan myös addukteja veden kanssa $[M-2H+H_2O]^-$. Loput määrytykset tehtiin vain negatiivisella ionisoinnilla.

Varsinaisten näytteiden fenolisten yhdisteiden ionisoituminen ja pilkkoutuminen (MS^n) määritettiin skannausalueella m/z 50–1000 (minimal signal required 500). Aluksi mitattiin näytteen TIC täydellisestä massaspektrometristä. Ensisijaisesti mittauksessa määritettiin pienikokoisempia fenolisia yhdisteitä, joiden m/z -suhde < 650 . Kuvaajatyypinä käytettiin ensin peruspiikkiä (engl. base peak), joka vaihdettiin massan vaihteluväliin (engl. mass range). Molekyyli-ioni $[M-H]^-$ pilkottiin ioniloukun tandemmassaspektrometrian avulla MS-MS-tuoteioneiksi ja siitä edelleen MS-MS-MS-tuoteioneiksi. MS^2 :een ja MS^3 :een pilkkomisen törmäysenergiaa säädettiin lähtöionien pilkkoutumisen mukaan.

Mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan hillonäytteiden TIC-kromatogrammit käytiin läpi ja grammeista havaituille tyypillisille yhdisteille luotiin valitun ionin kromatogrammit. Lisäksi arbutiinille ja floritsiinille luotiin omat valitun ionin kromatogrammit. Yleisimpiä taustakohinasta aiheutuvia häiriöioneja suljettiin pois menetelmästä.

3.3.3.3 Tulosten käsittely

Näyteajojen tulokset käytiin läpi kaikilla valitun ionin kromatogrammeilla. Havaitut signaalit integroitiin manuaalisesti kromatogrammista ja intensiteetit taulukoitiin Excel-tilukoon. Yhdisteiden luokitteluperusteena käytettiin ensisijaisesti yhdisteen retentioaikaa. Aluksi retentioaikaliukumana pidettiin 0,05 minuuttia, mutta tämä osoittautui liian kapeaksi aikaliukumaksi. Normaaliksi retentioaikavaihteluksi tulkittiin myöhemmin 0,03-0,09 min.

Lisäksi yhdisteitä luokiteltiin käymällä läpi yhdisteiden spektrejä ja pilkkoutumiskuvioita. Yhdisteiden tunnistamisessa apuna käytettiin floritsiinin ja arbutiinin malliaineita sekä kirjallisuutta (liitteet 2, 4, 5 ja 7; Aaby ym. 2007; Aaby ym. 2012; Jianghao ym. 2012). Yhdisteiden joukosta pyrittiin tunnistamaan pääasialliset lajityypilliset yhdisteet. Näytteestä tunnistettujen yhdisteiden tiedot (mm. nimet, retentioajat, molekyyli-ionit, pilkkoumat) kerättiin ylös Excel-tilukoon. Yhdisteistä PCA:han valittiin vain yhdisteet, joiden intensiteetti oli $> 10\,000$.

Kesken tutkimusosion näytemääritysten välissä laitteisto huollettiin, jonka jälkeen näytteiden tulokset muuttuivat vanhoihin tuloksiin verrattuna. Huollon jälkeisissä tuloksissa yhdisteiden intensiteetit todettiin moninkertaisiksi aiempiin tuloksiin verrattuna. Muutoksen pääteltiin johtuvan huollon aikana muutetusta näytteen sähkösumutuksen suorasyöttökärjen (engl. probe needle) suuntauksesta: kärki oli ollut eri kulmassa ja lähempänä MS-sisääntulokartiota, mistä johtuen yhdisteiden määrittäksen herkkyys kasvoi. Huollon yhteydessä laitteisto oli kalibroitu uudelleen, mikä myös saattoi vaikuttaa tuloksiin. Mansikkahillosta oli tehty määrittäksiä sekä ennen huoltoa että huollon jälkeen, joten tuloksia vertailtiin keskenään. Näiden määrittästen avulla mansikkahillon vanhojen tulosten yksittäisten yhdisteiden intensiteeteille laskettiin kertoimet, joiden avulla aineistosta saatiin vertailukelpoista. Samoja kertoimia käytettiin osittain myös omenahillon yhdisteille. Osa omenahillon yhdisteistä oli kuitenkin sellaisia yhdisteitä, mitä mansikkahillonäytteestä ei havaittu, joten näille yhdisteille ei voitu määrittää kerrointa. Koska käytetty menetelmä ei ollut kvantitatiivinen, pääteltiin, että kyseiset yhdisteet voitiin silti sisällyttää PCA:han.

Lisäksi käytäessä kaupallisten näytteiden TIC-kromatogrammeja uudelleen läpi havaittiin sellaisten yhdisteiden molekyyli-ioneja, joita ei ollut mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillonäytteissä. Nämä yhdisteet olisi pitänyt sisällyttää PCA:han vastaavasti kuten aromiyhdisteiden analyysissä.

3.3.3.4 Floritsiinin määrittelyn varmistus

Floritsiinin määrittely mansikasta varmistettiin lisäkokeella. Näytteenä käytettiin samaa pakastemansikkaa, jota aiemmissakin määrittelyissä oli käytetty (taulukko 1). Mansikoiden annettiin sulaa huoneenlämmössä ennen homogenointia. Varmistuskoe tehtiin kahtena rinnakkaisnäytteenä. Ultraäänituotto suoritettiin vastaavalla tavalla kuin kappaleessa 3.3.3.1.

UHPLC-MS-määrittely tehtiin samalla Thermon LTQ-Oribitrap-laitteistolla kun aiemmat määrittelyt, mutta laitteiston Orbitrap-osalla. Näytteen injektioilavuus oli 5 µl. Tässä määrittelyssä kolonnina käytettiin aiemmista määrittelyistä poiketen lyhyempää Acquity UPLC® BEH C18-kolonnia (2,1 mm, 50 mm, partikkelikoko 1,7 µm). Myös aiemmista ajoista poiketen ajoliuksina käytettiin 0,1-prosentista HCOOH:a Q-POD-vedessä (A) ja 1-prosentista HCOOH:a asetonitrilissä (B). Käytetty gradientti ja parametrit olivat samat kuin taulukoissa 6 ja 7. Ensimmäisessä TIC-mittauksessa resoluutio oli 120 000 ja toisessa ja kolmannessa 15 000.

Floritsiinin malliaineen (10 mg/l metanolissa) avulla selvitettiin yhdisteen tarkka massa, isotooppijakauma sekä retentioaika. Tämän jälkeen vastaavat tiedot määritettiin mansikkänäytteistä.

3.3.4 Tulosten tilastollinen käsittely

Tulosten käsittely ja tilastolliset analyysit tehtiin Microsoft Officen Excel 2010 ja Camon The Unscrambler X 10.1 -ohjelmistoilla. Sekä aromiyhdisteiden että fenolisten yhdisteiden tulosaineisto (yhdisteiden retentioajat sekä signaalipiikkien intensiteetit) taulukoitiin Exceliin (vaakariveillä näytteet ja pystysarakkeissa yhdisteet). Rinnakkaisnäytteitä nimitettiin havaintotapauksina (N) ja yhdisteitä muuttujina (K). Tulosaineisto autoskaalattiin PCA:n yhteydessä. Tulosten PCA suoritettiin vertaamalla yhdisteiden massaspektrometrinen signaalipiikkien intensiteettejä. Intensiteettejä käytettiin siitä huolimatta, että menetelmä ei ollut kvantitatiivinen. PCA:ssa käytettiin näytteen kaikkia rinnakkaisia arvoja. PCA:ssa aineistolle suoritettiin myös täysi ristivalidointi sekä

epävarmuustesti optimaalista pääkomponenttimäärää käyttäen. PCA:ssa kummankin menetelmän tulospaineistoja vertailtiin keskenään seuraavasti:

- Mansikkahillo ja mansikkasose
- Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo ja kurpitsahillo
- Mansikkahillo, omenahillo ja 5–50 % omenahilloa sisältäneet mansikkahillot
- Mansikkahillo, päärynähillo ja 5–50 % päärynähilloa sisältäneet mansikkahillot
- Mansikkahillo, kurpitsahillo ja 5–50 % kurpitsahilloa sisältäneet mansikkahillot
- Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo, kurpitsahillo ja kaupalliset näytteet
- Mansikkahillo ja kaupalliset näytteet

Lisäksi itse tehtyjä väärennöshilloja verrattiin pelkästään mansikkahilloon ilman vertailuhilloa (joko omena-, päärynä- tai kurpitsahillo). Tulosten tulokinnassa tarkasteltiin Scores- ja Loadings-kuvaajia pääkomponenttien suuntaisesti: poikittaisviivalla 1. pääkomponentti (PC1) ja pystyviivalla 2. pääkomponentti (PC2). Mitä kauempana näytteet tai yhdisteet olivat toisistaan PC1-viivalla, sitä enemmän ne poikkesivat toisistaan. Työssä tarkasteltiin vain kahta ensimmäistä komponenttia (PC1 ja PC2), sekä niiden selittämää osuutta kokonaivaihtelusta, sillä lähtökohtana oli tarkastella kvalitatiivisia eroja. Yksittäiset rinnakkaiset näytteet eli havaintotapaukset (N) vaikuttivat Scores-kuvaajaan ja yksittäiset aromi- tai fenoliyhdisteet eli muuttujat (K) puolestaan Loadings-kuvaajaan. Lisäksi tarkasteltiin Scores- ja Loadings-kuvaajien yhdistettyä Bi-plot-kuvaajaa. Kuvaajista katsottiin, oliko tulospaineistossa rinnakkaisten näytteiden ryhmittymistä ja miten näytteet jakaantuivat. Mahdollisten tilastollisten ääriarvojen läsnäolo tarkistettiin Hotellin T^2 -ympyrän avulla. Ääriarvolla tässä yhteydessä tarkoitettiin mahdollisesti näyttemäärityksessä tapahtuneesta satunnaisen tai systemaattisen virheen johdosta poikkeavaa näytettä, tai näytettä, jonka yhdisteet poikkesivat näytteiden erilaisuudesta johtuen muista näytteistä niin paljon, että näyte sijoittui ympyrän ulkopuolelle. Jatkotarkasteluun yhdisteistä valittiin ne, jotka aiheuttivat eron vertailtujen ryhmien välillä pääkomponenttien perusteella. Kyseiset yhdisteet pyrittiin tunnistamaan.

3.3.5 Menetelmien toistettavuus ja saantokoe

Näytteet analysoitiin kolmena rinnakkaisena näytteenä kummallakin menetelmällä ja lisäksi tehtiin 3-10 toistokoetta itse tehdystä mansikkahillonäytteestä (taulukko 7). Toistokokeista havaittujen yhdisteiden intensiteettien avulla laskettiin uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD). 80 % rinnakkaisista näytteistä tuli antaa samanlaiset tulokset yhdisteiden intensiteeteistä ($RSD \leq 20 \%$, jolloin 80 % näytteistä antaa saman tuloksen). Lisäksi toistettavuutta arvioitiin tarkastelemalla toistokokeiden PCA-kuvia (PC1 ja PC2).

Taulukko 7. SPME-GC-MS- ja UHPLC-MS-menetelmien toistokokeet.

SPME-GC-MS		UHPLC-MS	
toistopäivä	rinnakkaisten määrä	toistopäivä	rinnakkaisten määrä
16.2. + 18.2.	3	28.4.	3
5.6.	6	4.6.	6
15.6.	6	11.6.	3
	yht. 15		yht. 12

Lisäksi tehtiin saantokoenäyte lisäämällä tunnettu määrä omenan merkkiyhdisteenä pidetyn floritsiinin kantaliuosta mansikkahilloon. Hillona saantokokeessa käytettiin samaa itse tehtyä mansikkahilloa kuin muissa näytteissä. Saantokoe voitiin tehdä vain UHPLC-MS-menetelmän osalta. Saantokoenäytteen haluttu floritsiinin pitoisuustaso oli noin 10 mg/l UHPLC:ssa käytetyssä näyteliuoksessa. Saantokokeet tehtiin kolmena rinnakkaisena. Ensimmäisessä saantokokeessa 5 grammaan näytettä lisättiin 0,1 ml floritsiinin kantaliuosta (1000 mg/l floritsiinia Q-POD-vedessä), jolloin näyteliuoksen 10 ml:n lopputilavuuteen floritsiinin vahvuudeksi saataisiin noin 10 mg/l. Lisäksi saantokoe tehtiin toisella tavalla lisäämällä 0,1 ml floritsiinin kantaliuosta vasta uuton lopussa 10 ml:n mittapulloon. Floritsiinin vahvuus oli tällöin vastaavasti noin 10 mg/l näyteliuoksen 10 ml:n lopputilavuudessa.

Floritsiinin pitoisuudet näyteliuoksessa (mg/l) ja hillonäytteissä (mg/kg) laskettiin floritsiinin malliaineliuoksen avulla, jonka pitoisuus oli tunnettu. Pitoisuus suhteutettiin floritsiinin m/z 435 -ionin intensiteettiin. Floritsiinin pitoisuudet laskettiin myös itse tehdyille omena- ja mansikkahillonäytteille. Saantokoenäytteiden saantoprosentit laskettiin näyteliuoksen pitoisuuden perusteella.

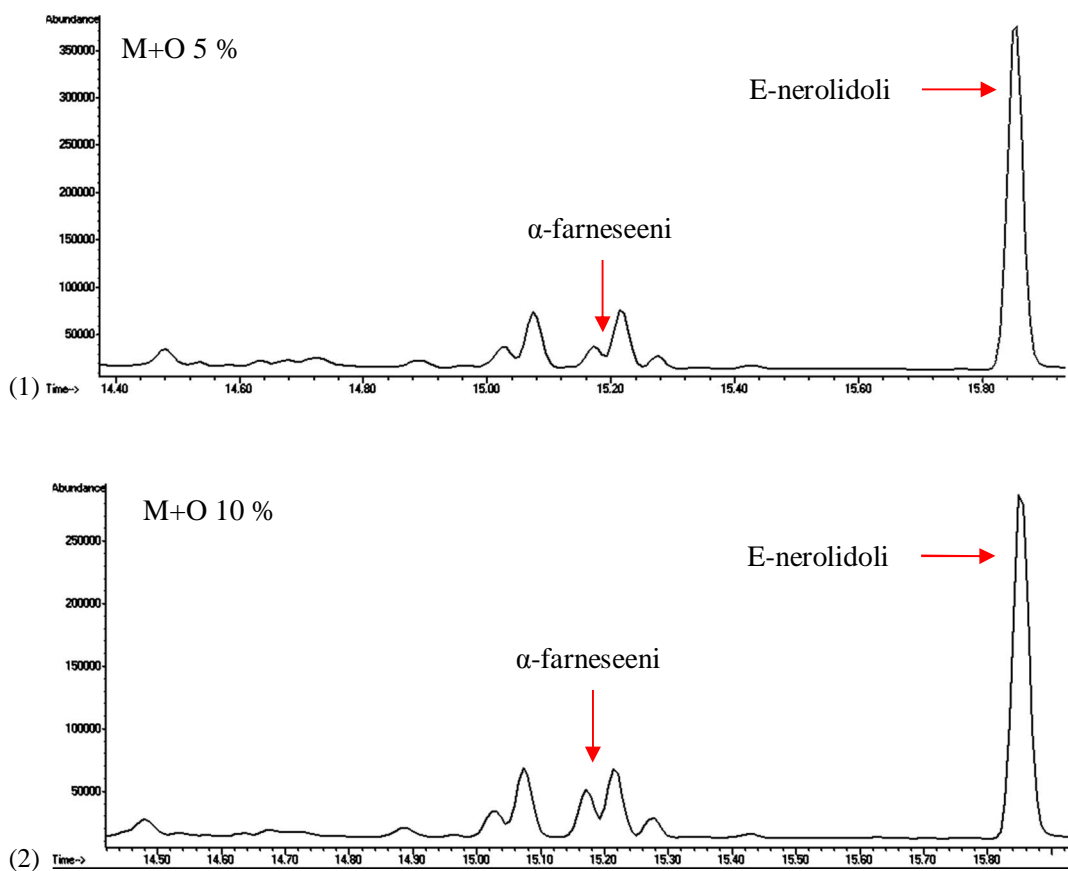
3.4 TULOKSET

3.4.1 Aromiyhdisteet

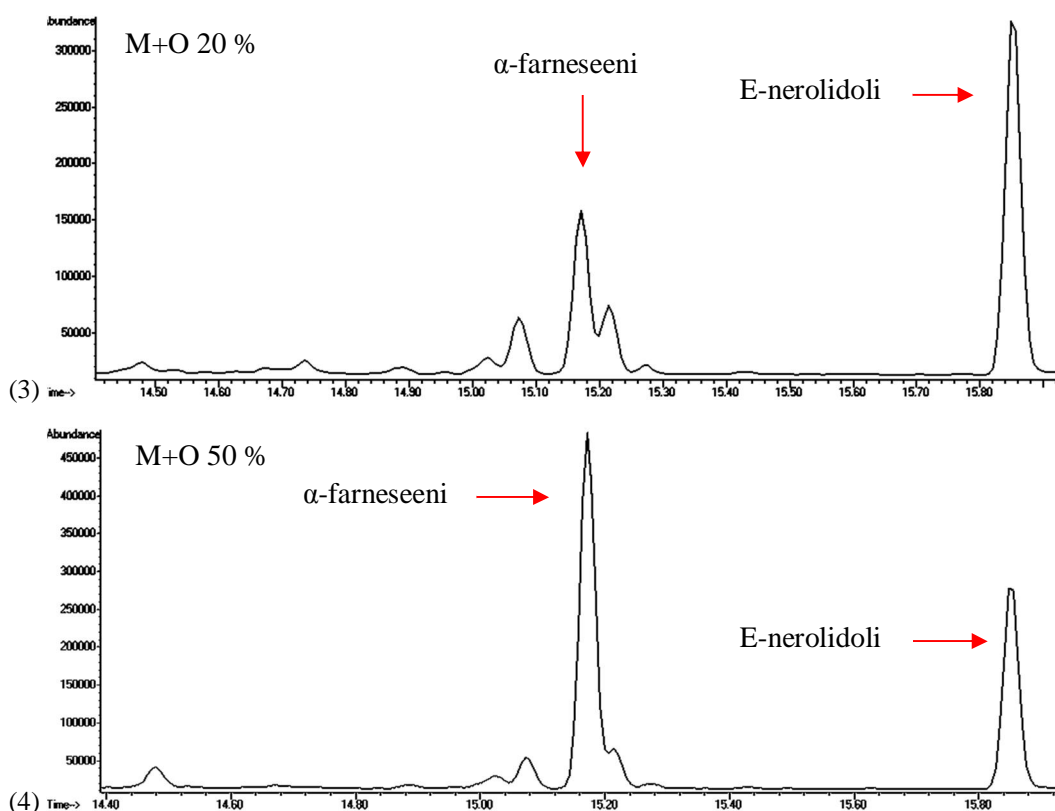
SPME-GC-MS-tekniikalla havaittuja erilaisia aromiyhdisteitä oli noin 50–80 jokaisessa näytteessä. Yhteensä kaikista näytteistä havaittiin vajaa 200 erilaista aromiyhdistettä, joista noin 130 tunnistettiin alustavasti NIST- ja Wiley-spektritietokantojen sekä kirjallisuuden avulla. Myös tunnistamatta jääneet yhdisteet sisällytettiin PCA:han lukuun ottamatta säilöntäaineita.

Itse tehdyistä mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloista havaittiin kullekin kasville tyypillisiä aromiyhdisteitä (liite 12). Tyypillisiä aromiyhdisteitä mansikkahillolle (lajike

Polka) olivat muun muassa heksaanihappo, E-nerolidoli, 2-metyyli-2-butanol, γ -dodekalaktoni, α -muuroleeni, mesifuraani ja linalooli. Omenahillolle (lajike Ida Red) tyypillisiä yhdisteitä olivat esimerkiksi α -farneseeni ja α -bergamoteeni sekä päärynähillolle (lajike Conference) etyyli-(E,Z)-2,4-heksadienoaatti ja metyyli-(Z,E)-2,4-dekadienoaatti. Kurpitsahillolle (lajike Butternut) ominaisia yhdisteitä olivat puolestaan α -iononi ja β -iononi. Monet aromiyhdisteet havaittiin useammastakin puhdasmatriisista, kuten heksyyliasetaatti, dekanaali, nonaanihappo, heksyyliheksanoaatti, trans- β -damaskenoni ja trans-geranyliaseton. Lisäksi kaupan mansikkahillonäytteistä havaittiin sellaisia yhdisteitä, joita ei havaittu itse tehdystä mansikkahillosta, esimerkiksi etyylibutanoaatti ja heksyyliasetaatti. Näyttemääritysten kromatogrammeja käytiin läpi myös yksitellen. Muun muassa omenahillolla jatkettujen itse tehtyjen mansikkahilloväärennösten aromikoostumusten eroja tarkasteltiin (kuva 18). α -farneseenin intensiteetti kasvoi ja E-nerolidolin intensiteetti pieneni siirryttäessä 5 % omenahilloa sisältäneestä mansikkahillosta 50 % omenaa sisältäneeseen seokseen.



Kuva 18. Mansikkahillon (M) ja omenahillon (O) malliväärennösseosten aromikoostumusten GC-MS-kromatogrammit tietyltä aikaväliltä. Lisätyn omenahillon määrät mansikkahilloon olivat 5 % (1), 10 % (2), 20 % (3) ja 50 % (4). Jatkuu seuraavalla sivulla.



Kuva 18. Jatkoa edelliseltä sivulta. Mansikkahillon (M) ja omenahillon (O) malliväärennöseosten aromikoostumusten GC-MS-kromatogrammit tietyltä aikaväliltä. Lisätyn omenahillon määrät mansikkahilloon olivat 5 % (1), 10 % (2), 20 % (3) ja 50 % (4).

3.4.2 Fenoliset yhdisteet

3.4.2.1 Floritsiinin havaitseminen näytteistä

Floritsiini havaittiin UHPLC-MS-tekniikalla itse tehdystä omenahillosta samalla retentioajalla kuin flortisiinin malliaine (RT noin 6,18). Näytteestä havaitun floritsiinin molekyyli-ioni oli deprotonoitunut $[M-H]^-$ ja sen m/z -suhde oli 435. Floritsiini havaittiin sekä TIC:sta että valitun ionin (m/z 435) kromatogrammista. Omenahillosta havaitulla floritsiinilla oli vastaavat MS^2 - ja MS^3 -pilkkoumat (m/z 273 ja m/z 167) kuin malliaineella (kuva 17), mikä vahvisti havaintoa. Omenahillon lisäksi pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteenä pidetty floritsiini havaittiin vastaavasti myös itse tehdystä mansikkahillonäytteestä (liite 13). Floritsiini havaittiin myös itse tehdystä mansikkasoseesta sekä kaikista itse tehdyistä väärennöseosshilloista ja kaupan mansikkahillonäytteistä. Päärynähillosta ja kurpitsahillosta floritsiinia ei havaittu.

Floritsiinin havaitseminen varmistettiin lisäksi lisäkokeissa. Varmistuskokeiden ajo-olosuhteiden sekä kolonnin muutoksesta johtuen floritsiinin retentioaika sekä kromatografia olivat hieman erilaisia verrattuna aiempiin määrityksiin (kappale 3.3.3.2). Floritsiinin malliaineen (10 $\mu\text{g/l}$) massaspektrometrissä molekyyli-ioni (RT 4,82) oli

deprotonoitunut $[M-H]^-$ ja sen m/z -suhde oli 435 (taulukko 8 ja liite 14). Floritsiinin kromatografinen erottuminen oli poikkeavaa aiempiin ajoihin nähden ja floritsiini retentoi kaksoishuippuisena piikkinä. Retentioajalla 4,83 Polka-lajikkeesta tehdystä mansikkasosenäytteestä havaittiin kuitenkin vastaava deprotonoitunut molekyyli-ioni $[M-H]^-$, jonka m/z -suhde oli 435 (liite 15). Floritsiinin tarkka massa malliaineajossa oli 435,12918 amu ja mansikkasosenäytteessä 435,12930 amu, jotka olivat 0,28 ppm:n erotuksella vastaavat. Ionille m/z 435 havaittiin alkuaineiden isotoopeista aiheutuvat signaalit m/z 436 ja m/z 437. Floritsiini ($C_{21}H_{24}O_{10}$) sisältää 21 hiiltä rakenteessaan. Ionien m/z 435 ja m/z 436 intensiteettien perusteella hiilen ^{13}C -isotooppien määrä oli noin 22,1 % molekyyli-ionin intensiteetistä eli vastasi riittävällä tarkkuudella odotettua $^{12}C : ^{13}C$ -suhdetta (1). Floritsiinin isotooppijakaumat signaaleille m/z 436 ja m/z 437 olivat vastaavat myös mansikkasosenäytteessä (taulukko 8).

$$C: 21 \times 1,1 \text{ (luonnossa } ^{13}C\text{-isotooppia noin } 1,1 \% \text{)} = 23,1 \% \quad (1)$$

Taulukko 8. Floritsiinin massaspektrin pilkeionit m/z 435, m/z 436 ja m/z 437 ja niiden %-osuudet intensiteeteistä. Lihavoituna molekyyli-ioni m/z 435 $[M-H]^-$.

Floritsiini malliaine (10 µg/l)		Floritsiini mansikkasoseesta	
MS m/z	%-osuus	MS m/z	%-osuus
435,12918	100	435,12930	100
436,13199	22,10	436,13248	22,12
437,13385	3,99	437,13474	3,36

Myös floretiiniksyloglukosidi havaittiin omena-, päärynä- ja mansikkahilloista sekä mansikkasoseesta. Floretiiniksyloglukosidin deprotonoituneen molekyyli-ionin $[M-H]^-$ m/z -suhde oli 567. Kurpitsahillosta ei havaittu tätä dihydrokalkoniyhdistettä.

3.4.2.2 Arbutiinin havaitseminen näytteistä

Arbutiini muodosti ajoliuoksen muurahaishapon kanssa addukti-ionin $[M+HCOOH-H]^-$, jonka m/z -suhde oli 317. Arbutiinin muurahaishappoaddukti havaittiin vain heikosti itse tehdyn päärynähillon UHPLC-MS-määrityksen massaspektristä. Addukti-onia ei pystytty pilkomaan MS^2 :een, joten arbutiinin havaitsemista ei pystytty varmistamaan. Arbutiinia ei havaittu myöskään muista näytteistä.

3.4.2.3 Muita fenolisia yhdisteitä

Kaikissa näytteissä oli noin 10–15 UHPLC-MS-tekniikalla havaittuja muita fenolisia yhdisteitä. Yhteensä näytteistä löydettiin noin 40 erilaista fenoliyhdistettä, joista osalle löydettiin alustava tunnistus. Mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloista havaittiin

kasveille tyypillisiä fenolisia yhdisteitä (liite 13). Mansikkahillosta havaittuja fenoliyhdisteitä olivat muun muassa pelargonidiini-3-glukosidi, proantosyanidiini B3, (+)-katekiini, kumaryyliheksosidi, ferulahapohexosidijohdannainen sekä ellagihappo. Omenahillosta havaittiin esimerkiksi klorogeenihappoa ja 4-p-kumaryylikiniinihappoa. Päärynähillosta löytynyt tyypillisin yhdiste oli kversetiini-3-rutinosidi eli rutiini. Kurpitsahillosta havaitut yhdisteet olivat joko tunnistamattomia fenolisia yhdisteitä tai samoja fenolisia yhdisteitä kuin mansikassa, päärynässä ja omenassa, kuten kversetiini-johdannaisia.

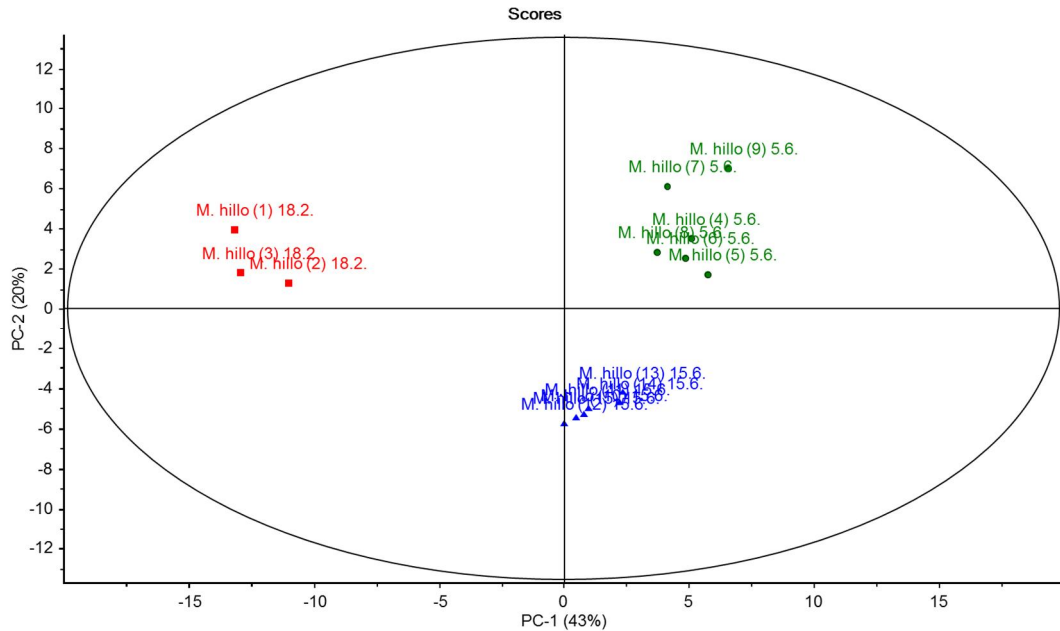
Monet fenoliset yhdisteet havaittiin useammastakin puhdasmatriisista. Esimerkiksi retentioajalla 3,90 havaittiin fenolinen yhdiste kaikista näytteistä. Yhdisteen deprotonoituneen molekyyli-ionin $[M-H]^-$ m/z -suhde oli 431. Yhdisteelle ei löydetty kirjallisuuden perusteella vastaavia MS^2 - MS^3 -pilkkoutumisia, joten yhdiste jäi tunnistamattomaksi. Lisäksi kaupallisista näytteistä havaittiin myöhemmin useita sellaisia fenolisia yhdisteitä, joita ei havaittu itse tehdyistä mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloista (liite 13). Näitä yhdisteitä olivat esimerkiksi kinnamoyyyliglukoosi ja kamferoli-3-kumaryyiglukosidi.

3.4.3 Menetelmien toistettavuus

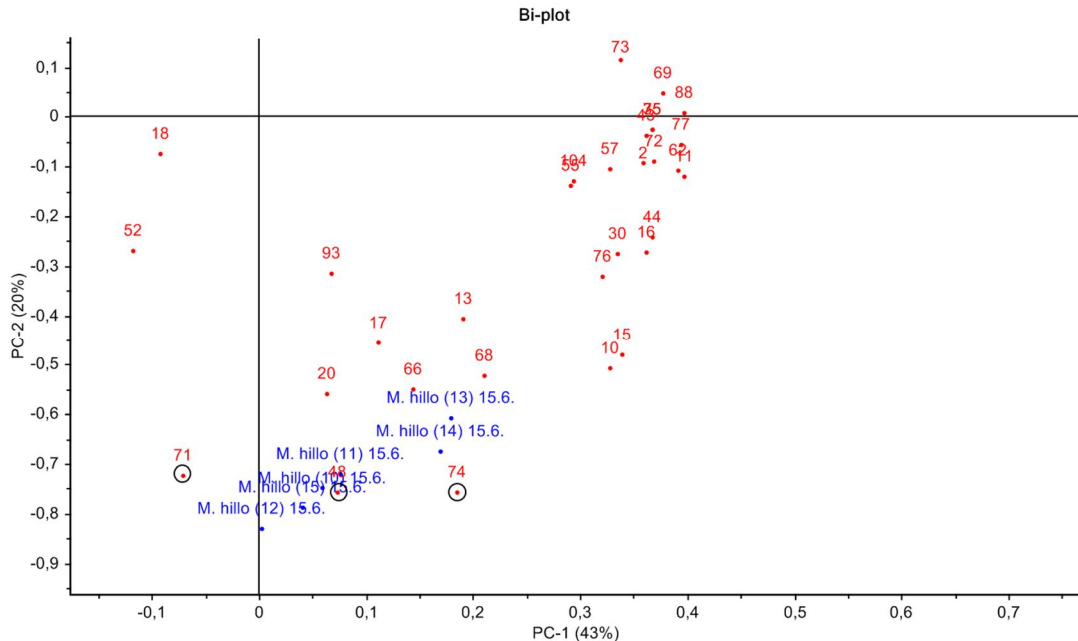
3.4.3.1 Aromiyhdisteiden määrittämenetelmän toistettavuus

Itse tehdystä mansikkahillosta tehty kolme toistokoetta erosivat toisistaan aromikoostumuksen perusteella erillisinä ryhminä, mikä selitti 43 % näytteiden välisestä kokonaisvaihtelusta (kuva 19). Tämä nähdään kuvaajan poikittaisviivalta (ensimmäinen pääkomponentti, PC1). Toistokokeissa ei havaittu ääriarvoja (ei näytteitä Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolella). Vaikka näytematriisina kaikissa toistokokeissa oli sama hillo, helmikuussa tehty toistokoe erottui aromikoostumuksensa perusteella kesäkuussa tehdyistä määrittäyksistä. Kesäkuussa tehty kokeet erottuivat myös toisistaan selkeinä ryhminä, mikä selitti 20 % kokonaisvaihtelusta. Tämä nähdään kuvaajan pystyviivalta (toinen pääkomponentti, PC2). Helmikuussa tehty toistokoe oli aromikoostumukseltaan kuitenkin lähempänä kesäkuun alussa tehtyä toistokoetta kuin kesäkuun puolivälissä tehtyä koetta. Aromiyhdisteiden määrittämenetelmän toistokokeiden yhteenlaskettu RSD % oli 51 %. Helmikuun toistojen RSD % oli 37 % ja kesäkuun 41 % (kesäkuun toistosarjat erikseen 35 % ja 28 %). Asetettu taso RSD % < 20 % ylittyi siten kaikkien toistosarjojen osalta, mikä kertoo aromiyhdisteiden SPME-GC-MS-määrittämenetelmän huonosta toistotarkkuudesta. Toistokokeiden Bi-plot-kuvaajassa mustalla renkaalla merkityt yhdisteet nro 48, 71 ja 74

selittivät esimerkiksi kesäkuun myöhäisemmän toistokokeen eroavuutta kahdesta muusta toistosarjasta, eli olivat kyseiselle toistosarjalle tyypillisiä yhdisteitä (kuva 20). Nämä yhdisteet olivat tunnistamattomia yhdisteitä, jotka saattoivat aiheutua myös häiriötekijöistä. Yhdisteiden (nrot 48, 71 ja 74) intensiteettien RSD:t olivat 56 %, 42 % ja 55 % edellä mainitussa järjestyksessä.



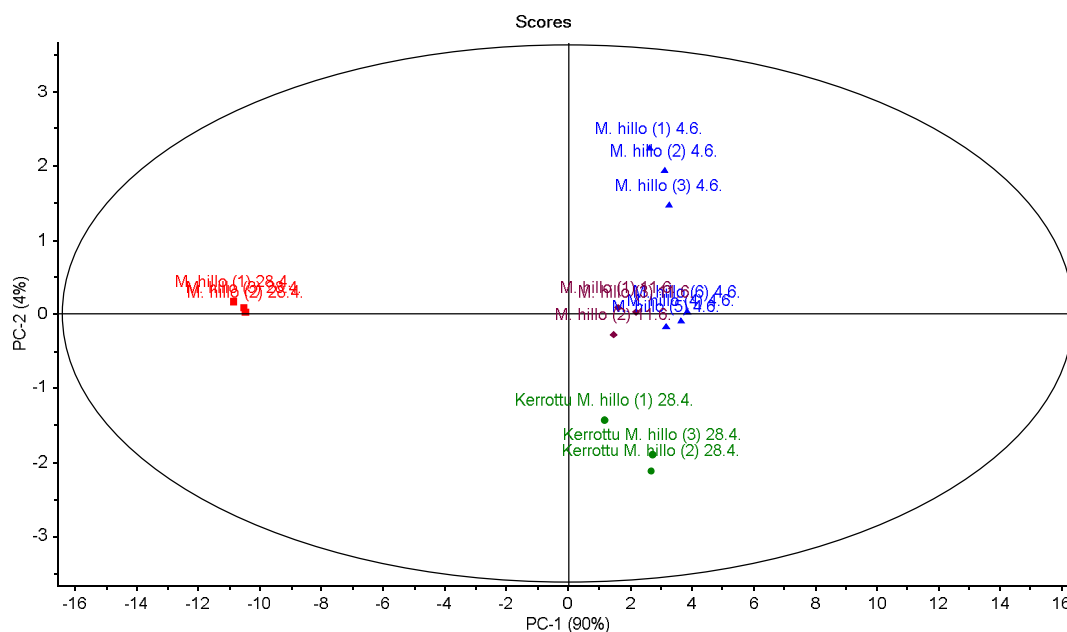
Kuva 19. Aromiyhdisteiden määrittämenetelmän toistokokeiden PCA. Yksi mansikkahillotoistokoe tehtiin helmikuussa (punainen □) ja kaksi koetta kesäkuussa (vihreä ● ja sininen ●). Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. Kussakin näytesarjassa oli kolme tai kuusi rinnakkaista näytettä (1-6). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 43 % ja PC2 20 %.



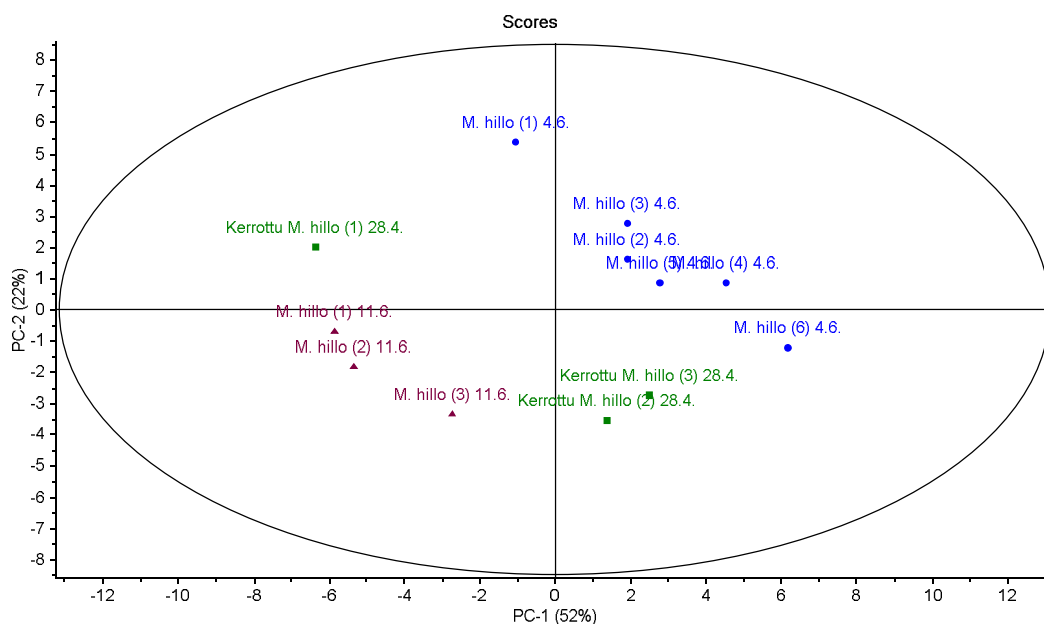
Kuva 20. Aromiyhdisteiden määrittämenetelmän toistokokeiden PCA:n Bi-plot-kuvaaja. Lähikuvassa on esitetty kesäkuussa tehdyn toistosarjan (sininen teksti) yhdisteitä (punaiset numerot). Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. Näytesarjassa oli kuusi rinnakkaista näytettä (1-6). Yhdisteet nro 48, 71 ja 74 on rengastettu toistosarjalle tyypillisinä yhdisteinä. Pääkomponenttien selityssasteet ovat samat kuin kuvassa 19.

3.4.3.2 Fenolisten yhdisteiden määrittämenetelmän toistettavuus

Mansikkahillon fenolisten yhdisteiden määrittämenetelmän toistokokeissa havaittujen yhdisteiden intensiteeteille laskettiin kertoimet, joiden avulla ennen laitteiston huoltoa ja huollon jälkeen tehtyjen määrittysten tuloksista saatiin vertailukelpoisia. PCA:ssa testattiin kesäkuun toistosarjoja huhtikuun toistosarjan kanssa sekä kerroinkorjattuna että kerroinkorjaamattomana (kuva 21). PC1 selitti jo 90 % kokonaisvaihtelusta, toisin sanottuna vaihtelu selittyi jo yksin laitteiston huollosta aiheutuneista intensiteettimuutoksista. Toistosarjojen keskinäinen hajonta oli selvästi suurempaa poistettaessa kerroinkorjaamaton toistosarja PCA-vertailusta (kuva 22). Toistokokeiden yhteenlaskettu RSD % olisi kerroinkorjaamattomana ollut 40 %, mutta kerroinkorjattuna RSD % oli 10 %. Sekä huhtikuun että kesäkuun toistokokeiden RSD % oli 9 %. Asetettu taso oli RSD % < 20 %, joten fenolisten yhdisteiden UHPLC-MS-määrittämenetelmän toistettavuus oli vaatimuksen mukainen.



Kuva 21. Fenolisten yhdisteiden määrittämenetelmän toistokokeiden PCA. Kesäkuun toistosarjoja (sininen • ja violetti ◐) verrattiin huhtikuun toistosarjan kanssa sekä kerroinkorjattuna (vihreä l) että kerroinkorjaamattomana (punainen r). Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 90 % ja PC2 4 %.



Kuva 22. Fenolisten yhdisteiden määritysmenetelmän toistokokeiden PCA. Kesäkuun toistosarjoja (sininen \bullet ja violetti \bullet) verrattiin huhtikuun toistosarjan kanssa pelkästään myös kerroinkorjattuna (vihreä \square). Testinäytteenä käytettiin itse tehtyä mansikkahilloa. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta tällöin 52 % ja PC2 22 %.

Toistokokeiden lisäksi tehtiin saantokoe käyttämällä floritsiinin malliainetta (10 mg/l metanolissa). Itse tehtyjen omena- ja mansikkahillonäytteiden sekä saantokokeiden floritsiinipitoisuudet laskettiin sekä UHPLC-määrityksessä käytetyssä näyteliuoksessa (mg/l) että hillonäytteessä (mg/kg) (taulukko 9).

Taulukko 9. Näyteiden ja saantokokeiden floritsiinin m/z 435 -ionin intensiteetit ja pitoisuudet näyteliuoksessa (mg/l) ja hillonäytteissä (mg/kg) sekä kokeiden saantoprosentit. Floritsiinin lisäys saantokoenäytteisiin oli tehty kahdella eri tavalla: lisäämällä floritsiinia suoraan näytteeseen punnituksen yhteydessä tai vasta näytejäännökseen uuton loppuvaiheessa. O=omena ja M=mansikka.

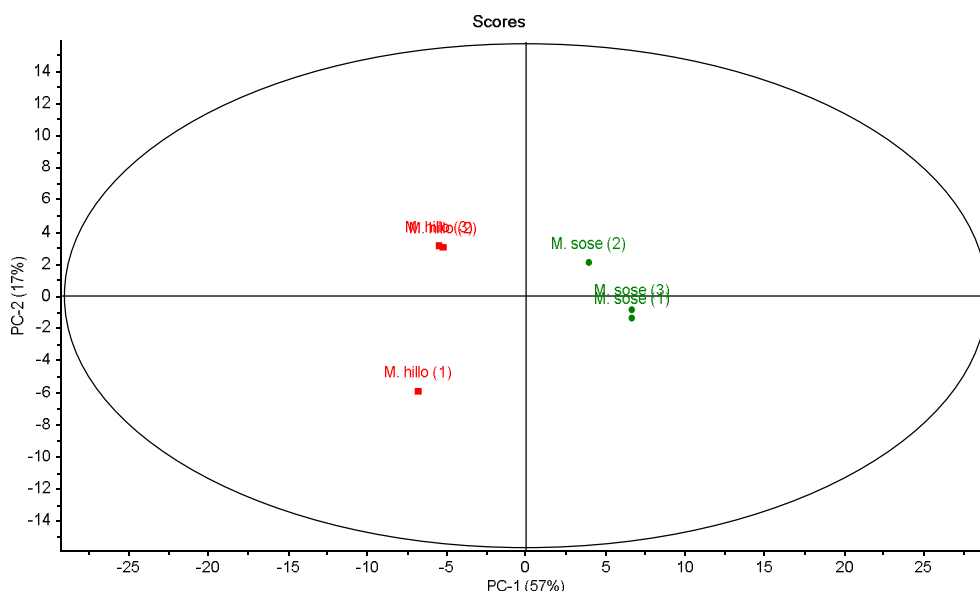
Näyte + ajopäivä	Floritsiinin m/z 435 -ionin intensiteetti	Floritsiinin pitoisuus näyteliuoksessa (mg/l)	Saanto %	Floritsiinin pitoisuus hillossa (mg/kg)
Floritsiinin malliaine 21.1.	22718404	10 mg/l	-	-
O. hillo (1) 28.4.	16687002	7,35 mg/l	-	14,69
O. hillo (2)	19632103	8,64 mg/l	-	17,28
O. hillo (3)	18737551	8,25 mg/l	-	16,50
M. hillo (1) 28.4.	2274545	1,00 mg/l	-	2,00
M. hillo (2)	2295795	1,01 mg/l	-	2,02
M. hillo (3)	2590895	1,14 mg/l	-	2,28
M. hillo (1) 4.6.	2321696	1,02 mg/l	-	2,04
M. hillo (2)	2329322	1,03 mg/l	-	2,05
M. hillo (3)	2387532	1,05 mg/l	-	2,10
M. hillo (4)	2445695	1,08 mg/l	-	2,15
M. hillo (5)	2408327	1,06 mg/l	-	2,12
M. hillo (6)	2575259	1,13 mg/l	-	2,27
M. hillo (1) 11.6.	2298095	1,01 mg/l	-	2,02
M. hillo (2)	2263420	1,00 mg/l	-	1,99
M. hillo (3)	2454358	1,08 mg/l	-	2,16
M. hillo näytelisäys (1) 11.6.	49765218	21,91 mg/l	219	43,81
M. hillo näytelisäys (2)	43093845	18,97 mg/l	190	37,94
M. hillo näytelisäys (3)	43924561	19,33 mg/l	193	38,67
M. hillo jäännöslisäys (1) 11.6.	47351817	20,84 mg/l	208	41,69
M. hillo jäännöslisäys (2)	39387388	17,34 mg/l	173	34,67
M. hillo jäännöslisäys (3)	41590862	18,31 mg/l	183	36,61

Keskimäärin Ida Red -lajikkeesta tehdyssä omenahillossa floritsiinia oli 8,08 mg/l liuospitoisuudessa ja 16,16 mg/kg näytteessä (tuorepainoa). Polka-lajikkeesta tehdyssä mansikkahillossa floritsiinin pitoisuus näyteliuoksessa oli keskimäärin 1,05 mg/l ja hillossa noin 2,10 mg/kg (tuorepainoa). UHPLC-MS-määrityksessä käytettyjen saantokoe-näyteliuosten tarkoitettu floritsiinin pitoisuustaso oli noin 10 mg/l. Floritsiinin pitoisuudeksi saantokokeiden näyteliuoksessa saatiin kuitenkin keskimäärin 19,45 mg/l ja ja saantoprosentiksi 194 %. Lisäyskokeista voitiin todeta, että lisäystavalla ei ollut suurta merkitystä saantoon, sillä kahden erilaisen lisäyskokeen rinnakkaismääritysten RSD % oli vain 8,6 %.

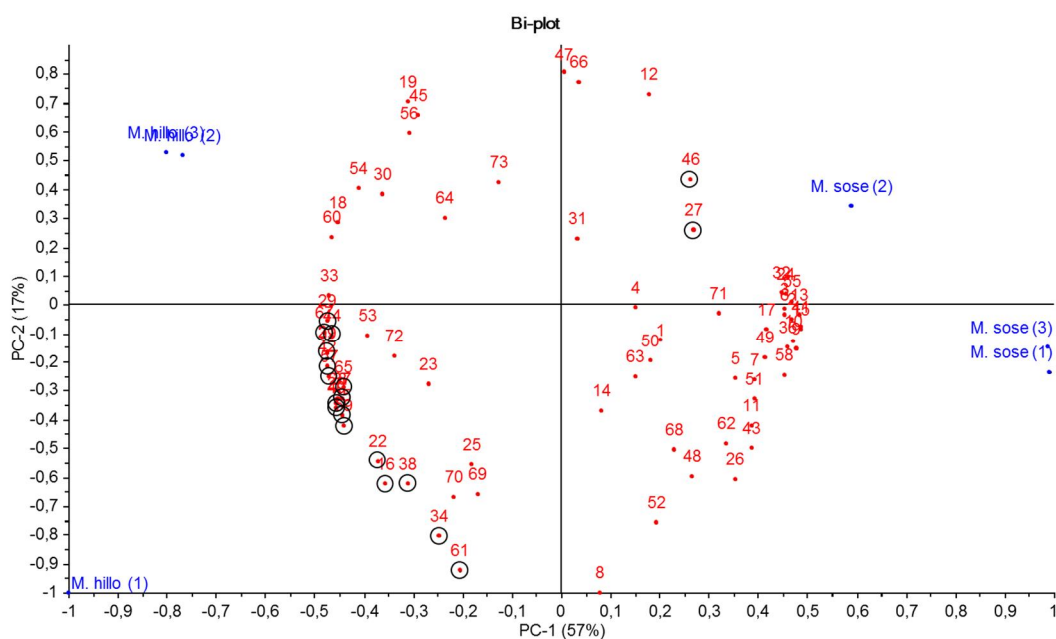
3.4.4 Mansikkahillon ja -soseen vertailu

3.4.4.1 Aromikoostumuksen erot

Mansikkahillon ja -soseen aromikoostumuksen erot selittivät jo 57 % näytteiden välisestä kokonaisvaihtelusta, toisin sanottuna samasta Polka-mansikkalajikkeesta tehty tuoresose ja mansikkahillo erosivat aromikoostumuksen perusteella toisistaan (kuva 23). PC1 ja PC2 selittivät yhteensä 73 % kokonaisvaihtelusta. Mansikkahillon aromiyhdisteet olivat intensiteetiltään keskimäärin 43 % pienempiä kuin mansikkasoseessa. Osalla yhdisteistä intensiteetin pieneneminen oli kuitenkin huomattavasti suurempi. Esimerkiksi α -muuroleenin intensiteetti hillossa oli keskimäärin vain kymmenesosa soseeseen verrattuna. Joidenkin yhdisteiden intensiteetti puolestaan kasvoi prosessoinnissa ja näiden yhdisteiden intensiteetti oli keskimäärin 38 % suurempi hillossa kuin soseessa. Tällaisia yhdisteitä olivat esimerkiksi linalooli ja dekanaali. Yksi mansikkahillon (M.hillo 1) ja yksi mansikkasoseen (M.sose 2) rinnakkaisista näytteistä poikkesi sarjojen kahdesta muusta rinnakkaisesta, mikä selitti 17 % kokonaisvaihtelusta (kuva 23). Tarkastelemalla Bi-plot-kuvaajaa saatiin selville yhdisteet, mitkä vaikuttivat eniten kyseessä oleviin näytteisiin (rengastetut yhdisteet lähimpänä kyseistä näytettä) (kuva 24). M. hillo (1) -näytteen yhdisteiden, kuten linaloolin ja etyylibentsoatin, intensiteetit olivat kyseisessä näytteessä keskimäärin hieman suurempia kuin kahdessa muussa rinnakkaisessa näytteessä. Mansikkasoseen rinnakkainen M. sose (2) poikkesi kahdesta muusta rinnakkaisesta kuitenkin vähemmän, kuin mitä ero oli mansikkahillojen rinnakkaisten välillä. Eroa aiheuttaneet yhdisteet olivat muun muassa SPME-kuidusta aiheutunut häiriöyhdiste (rengastettu nro 46) sekä 3-metyyli-4-nonanoni (rengastettu nro 27), jonka intensiteetti kyseisessä näytteessä oli hieman suurempi kuin kahdessa muussa rinnakkaisessa näytteessä.



Kuva 23. Polka-mansikkalajikkeesta tehdyn mansikkahillon mansikkahillon (punainen ■, M.hillo) ja mansikkasoseen (vihreä ●, M.sose) aromikoostumuksen PCA. Kummassakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 57 % ja PC2 17 %.

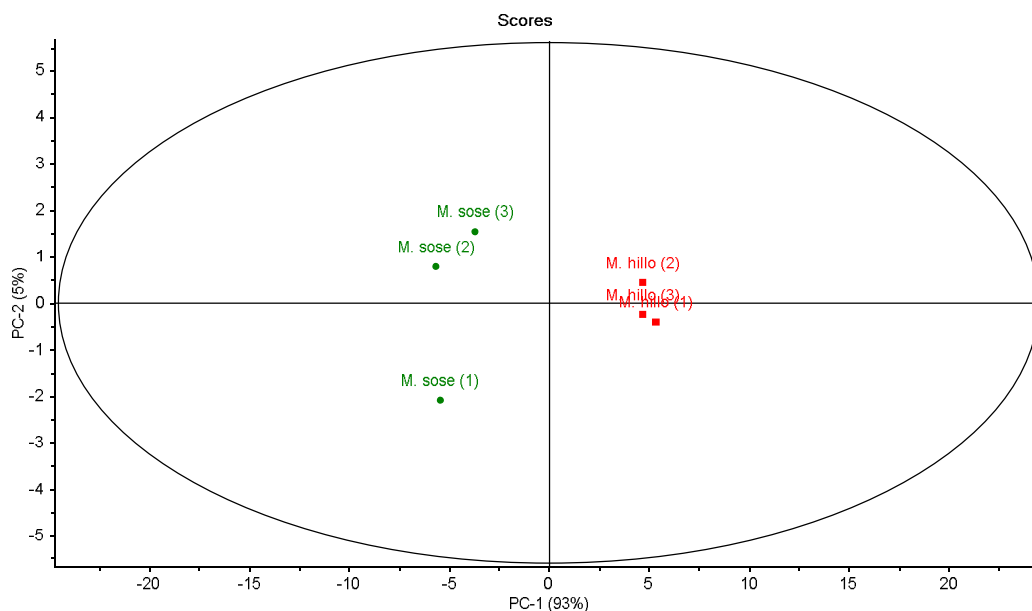


Kuva 24. Mansikkahillon ja mansikkasoseen aromikoostumuksen PCA:n Bi-plot-kuvaaja. Sininen teksti kuvaa rinnakkaisia hillo- tai sosenäytteitä ja punaiset numerot aromiyhdisteitä. Osa yhdisteistä on rengastettu M.hillo (1)- tai M.sose (2) -näytteille tyypillisinä yhdisteinä. Kummassakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). Pääkomponenttien selitysasteet ovat samat kuin kuvassa 23.

3.4.4.2 Fenolikoostumuksen erot

Mansikkahillon ja -sosen fenolikoostumuksen erot selittivät jopa 93 % näytteiden välisestä kokonaisvaihtelusta (kuva 25). Toisin sanottuna Polka-mansikkalajikkeesta tehty mansikkahillo ja tuoresose erosivat fenolisten yhdisteiden intensiteettien perusteella toisistaan. Mansikkahillon fenoliset yhdisteet olivat intensiteetiltään keskimäärin puolet pienempiä kuin mansikkasoseessa. Muutaman fenolisen yhdisteen intensiteetti puolestaan

kasvoi prosessoinnissa ja näiden yhdisteiden intensiteetti oli keskimäärin 70 % suurempi mansikkahillossa kuin mansikkasoseessa. Tällainen yhdiste oli esimerkiksi ellagihappo. Mansikkasoseen rinnakkaisnäytteiden välillä fenolisten yhdisteiden intensiteeteissä havaittiin enemmän hajontaa kuin mansikkahillon rinnakkaisnäytteiden välillä (ryhmittyminen PCA-kuvaajassa oli hajanaisempaa).

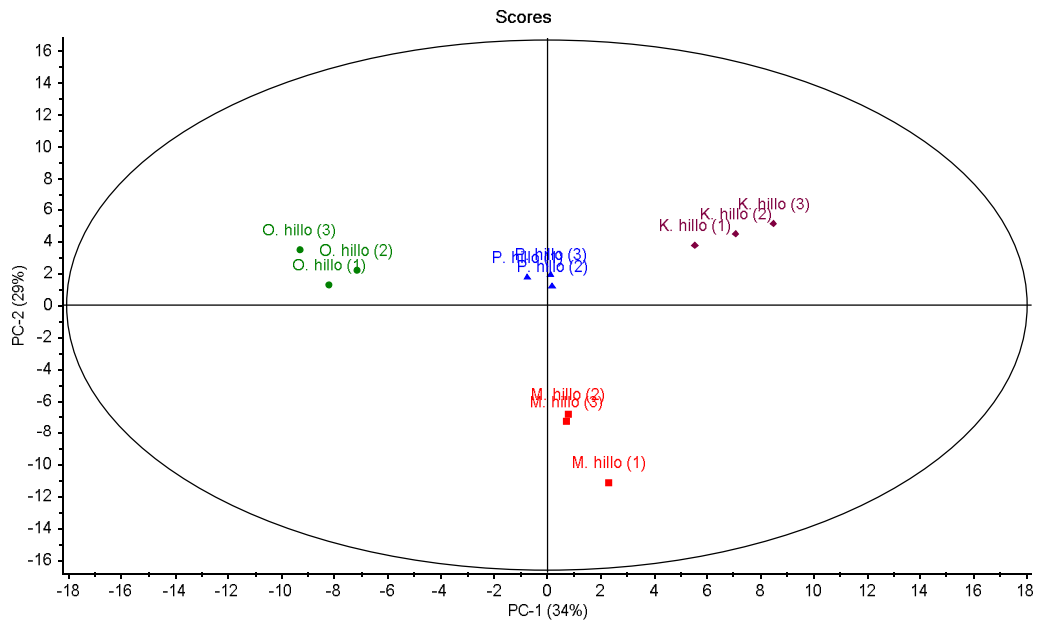


Kuva 25. Polka-mansikkalajikkeesta tehdyn mansikkahillon (punainen □, M.hillo) ja mansikkasoseen (vihreä ●, M.sose) fenolisten yhdisteiden koostumuksen PCA. Kummassakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 93 % ja PC2 5 %.

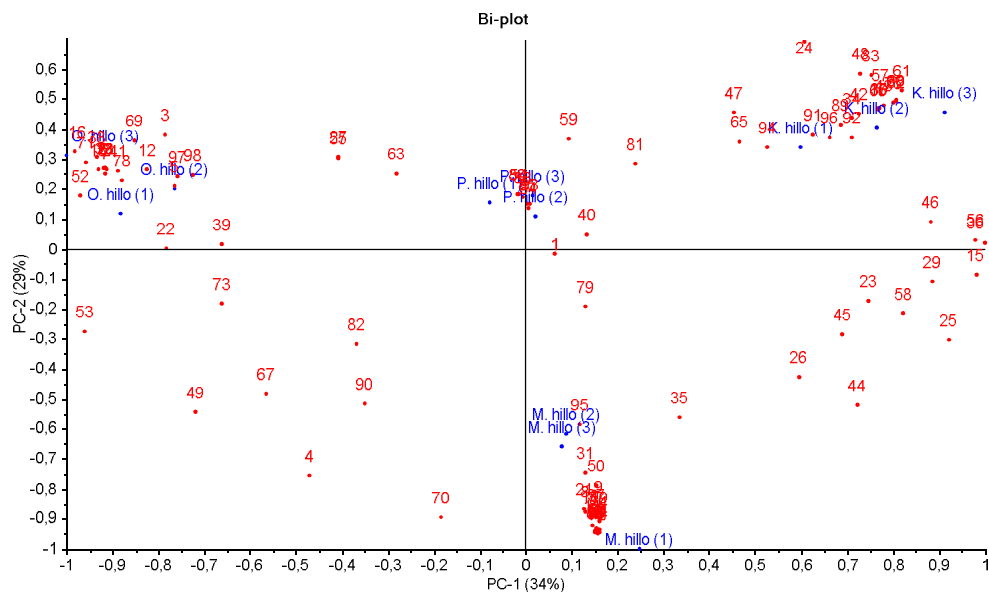
3.4.5 Itse tehtyjen hillojen vertailu

3.4.5.1 Aromikoostumuksen erot

Itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat toisistaan selkeinä ryhminä aromiyhdisteiden koostumuksen ja yhdisteiden intensiteettien perusteella (kuva 26). Bi-plot-kuvaajassa kullekin hillolle tyypilliset aromiyhdisteet kerääntyivät tiiviiksi ryhmiksi näytteiden ympärille (kuva 27). Kullekin hillonäytteelle tyypillisiä yhdisteitä käytiin läpi aiemmassa kappaleessa 3.4.1. Omenahillon ja kurpitsahillon aromikoostumukset erosivat toisistaan eniten, mikä selitti 34 % vaihtelusta. Mansikkahillon aromiyhdisteet poikkesivat muista hilloista seuraavaksi eniten (29 % kokonaisvaihtelusta). Päärynähillon aromikoostumus oli muista näytehilloista vähiten poikkeavin.



Kuva 26. Mansikkahillon (punainen ■, M.hillo), omenahillon (vihreä ●, O.hillo), päärynähillon (sininen ▲, P.hillo) ja kurpitsahillon (violetti ◆, K.hillo) aromikoostumuksen PCA. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 34 % ja PC2 29 %.

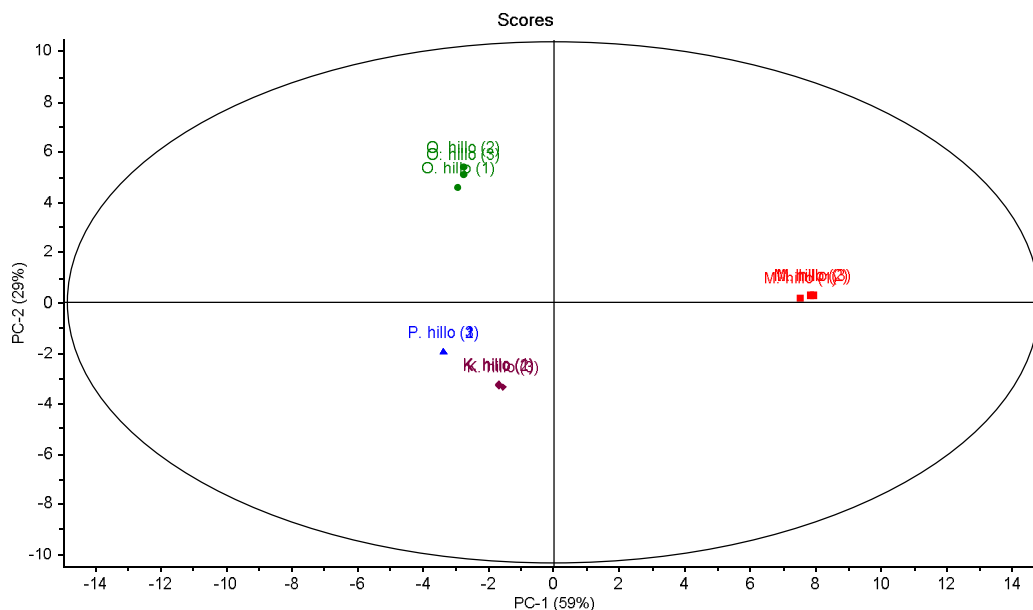


Kuva 27. Mansikkahillon (M.hillo), omenahillon (O.hillo), päärynähillon (P.hillo) ja kurpitsahillon (K.hillo) aromikoostumuksen PCA:n Bi-plot-kuvaaja. Sininen teksti kuvaa eri hillonäytteitä ja punaiset numerot aromiyhdisteitä. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). Pääkomponenttien selitysasteet ovat samat kuin kuvassa 27.

3.4.5.2 Fenolikoostumuksen erot

Itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat toisistaan selkeinä ryhminä fenolisten yhdisteiden koostumuksen ja yhdisteiden intensiteettien perusteella (kuva 28). Mansikkahillon fenolisten yhdisteiden koostumus erosi eniten muiden hillonäytteiden koostumuksesta, mikä selitti 59 % kokonaisvaihtelusta. Omenahillon

fenoliset yhdisteet poikkesivat kurpitsahillon yhdisteistä seuraavaksi eniten, mikä selitti 29 % kokonaisvaihtelusta.



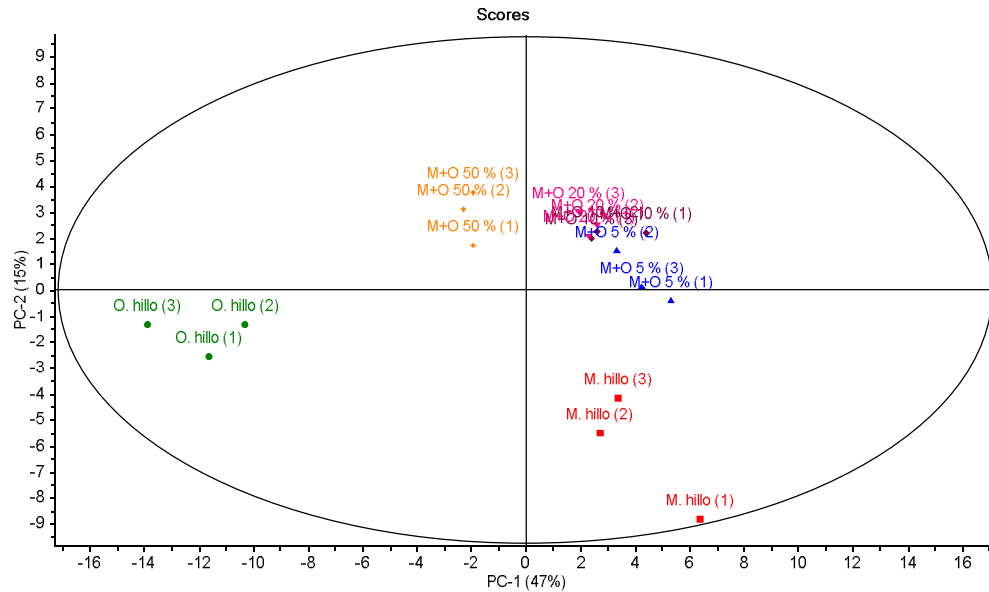
Kuva 28. Mansikkahillon (punainen □, M.hillo), omenahillon (vihreä ●, O.hillo), päärynähillon (sininen •, P.hillo) ja kurpitsahillon (violetti □, K.hillo) fenolisten yhdisteiden koostumuksen PCA. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 59 % ja PC2 29 %.

3.4.6 Väärentämisen havaitseminen hillon aromiyhdisteiden perusteella

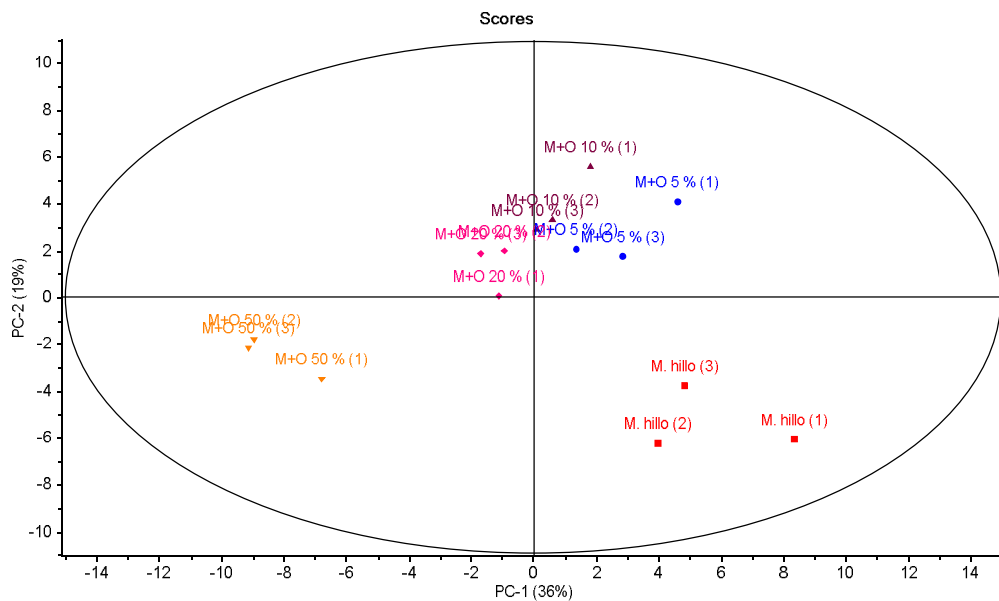
3.4.6.1 Mansikka- ja omenahillo sekä niiden seokset

Tarkasteltaessa omenahillolla jatkettujen itse tehtyjen mansikkahilloväärennöksien aromiyhdisteiden kromatogrammeja huomattiin, että omenalle tyypillinen yhdiste α -farneseeni erottui mansikan aromiyhdisteiden joukosta mansikkahilloista, joihin oli lisätty 5–50 % omenahilloa (kuva 18). Omenan α -farneseenin intensiteetti kasvoi ja E-nerolidolin intensiteetti pieneni siirryttäessä 5 % omenahilloa sisältäneestä mansikkahillosta 50 % omenaa sisältäneeseen seokseen. Väärentävän raaka-aineen tunnistus onnistui siten myös tarkastelemalla kromatogrammeja manuaalisesti tietokantojen avulla. Omenahillo erottui aromikoostumuksensa perusteella selvästi mansikkahillosta sekä mansikka- ja omenahilloista tehdyistä malliväärennöksistä myös PCA:ssa, mikä selitti 47 % kokonaisvaihtelusta (kuva 29). 50 % omenahilloa sisältänyt mansikkahillo oli kuvajaan perusteella odotuksen mukaisesti aromikoostumukseltaan kauimpana mansikkahillosta ja erottui selvemmin muista väärennösseoksista. Tämä selitti 15 % kokonaisvaihtelusta. 5–20 % omenahilloa sisältäneiden rinnakkaisten näyttemääritysten tulokset ryhmittivät kuvaajassa lomittain, mikä kertoo siitä, että aromikoostumusten erot seossuhteiden välillä eivät olleet tasaisia tai suuria. Ero mansikkahillon sekä mansikkahillon ja omenahillon

seosten välillä oli selkeä myös silloin, kun vertailuhillona toiminut omenahillo poistettiin PCA:sta (kuva 30).



Kuva 29. Mansikkahillon (punainen ■, M.hillo) ja omenahillon (vihreä □, O.hillo) sekä 5–50 % omenaa sisältävien väärennösmanikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja omenahillosta (O) erilaisina lisäyksinä: 5 % omenaa (sininen •, M+O 5 %), 10 % omenaa (violetti □, M+O 10 %), 20 % omenaa (pinkki △, M+O 20 %) ja 50 % omenaa (oranssi ○, M+O 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 47 % ja PC2 15 %.

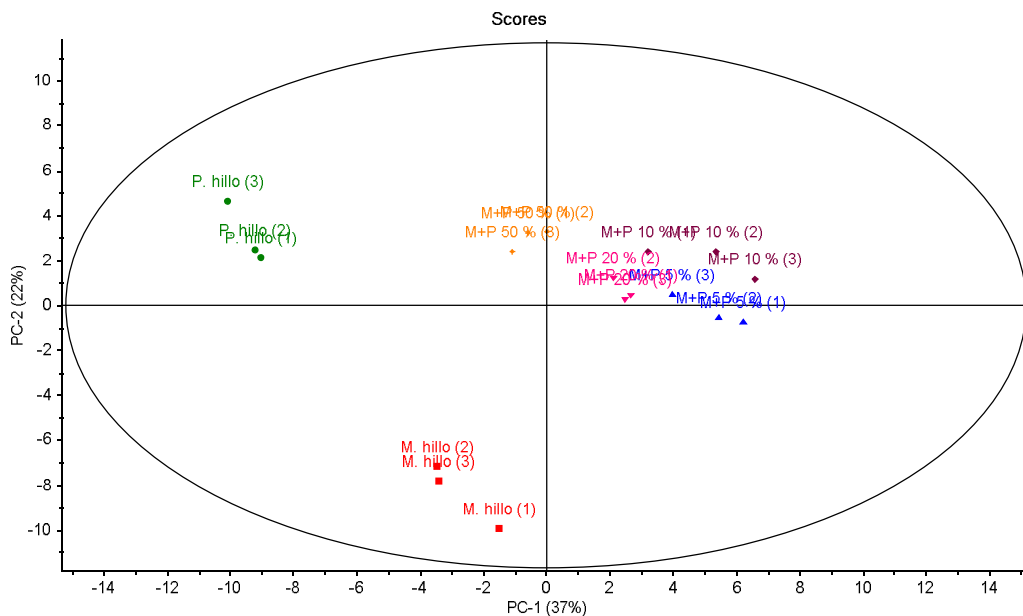


Kuva 30. Mansikkahillon (punainen ■, M.hillo) ja 5–50 % omenaa sisältävien väärennösmanikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja omenahillosta (O) erilaisina lisäyksinä: 5 % omenaa (sininen □, M+O 5 %), 10 % omenaa (violetti •, M+O 10 %), 20 % omenaa (pinkki △, M+O 20 %) ja 50 % omenaa (oranssi ○, M+O 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 36 % ja PC2 19 %.

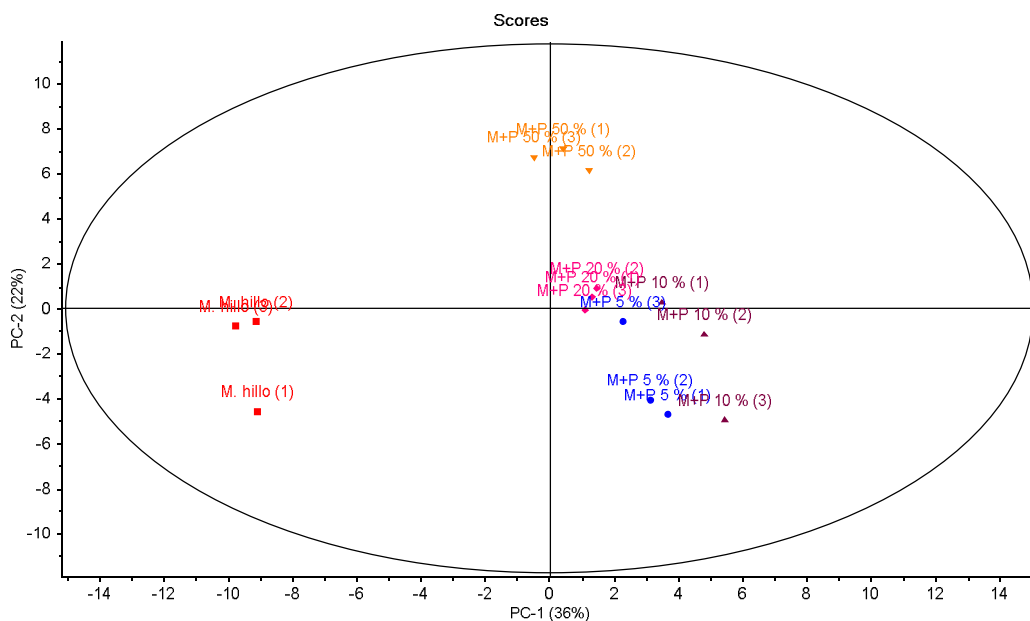
3.4.6.2 Mansikka- ja päärynähillo sekä niiden seokset

Myös itse tehty mansikkahillo ja päärynähillo sekä 5–50 % päärynähilloa sisältäneet väärennökset erottuivat toisistaan aromikoostumuksen perusteella (kuva 31). Mansikka-

hillo ryhmittyi PCA-kuvaajassa lähemmäs päärynähilloa kuin 5 % päärynähilloa sisältänyttä mansikkahilloa. Ero mansikkahillon ja päärynällä jatkettujen väärennösteosten välillä oli silti selkeä. Ero oli selvä myös silloin, kun vertailuhillona toiminut päärynähillo poistettiin PCA:sta (kuva 32).



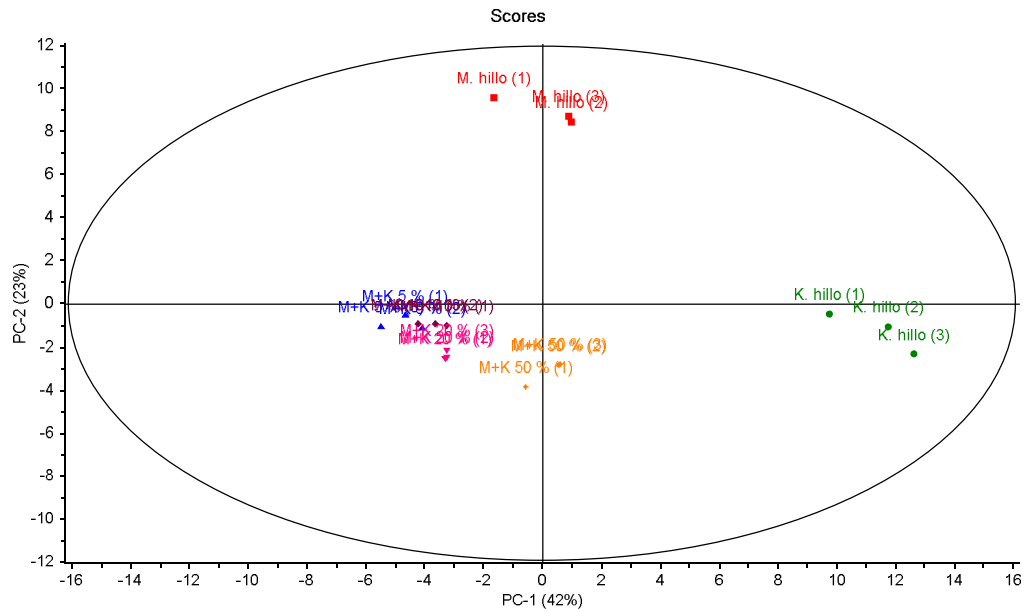
Kuva 31. Mansikkahillon (punainen □, M.hillo) ja päärynähillon (vihreä □, P.hillo) sekä 5–50 % päärynää sisältävien väärennösmansikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja päärynähillosta (P) erilaisina lisäyksinä: 5 % päärynää (sininen •, M+P 5 %), 10 % päärynää (violetti □, M+P 10 %), 20 % päärynää (pinkki □, M+P 20 %) ja 50 % päärynää (oranssi □, M+P 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 37 % ja PC2 22 %.



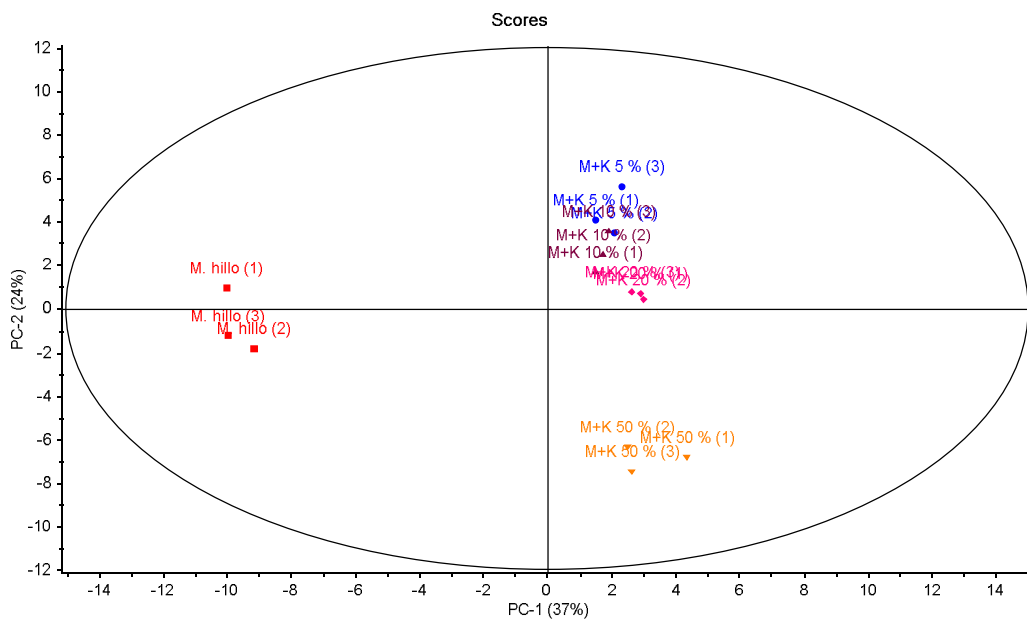
Kuva 32. Mansikkahillon (punainen □, M.hillo) ja 5–50 % päärynää sisältävien väärennösmansikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja päärynähillosta (P) erilaisina lisäyksinä: 5 % päärynää (sininen □, M+P 5 %), 10 % päärynää (violetti •, M+P 10 %), 20 % päärynää (pinkki □, M+P 20 %) ja 50 % päärynää (oranssi □, M+P 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 36 % ja PC2 22 %.

3.4.6.3 Mansikka- ja kurpitsahillo sekä niiden seokset

Mansikkahillon ja kurpitsahillon sekä kurpitsalla jatkettujen mansikkahilloväärennösten aromikoostumukset erottuivat myös toisistaan, mikä selitti 42 % kokonaisvaihtelusta (kuva 33). Ero mansikkahillon ja 5–50 % kurpitsaa sisältävien seosten välillä oli selkeä myös silloin, kun vertailuhillona toiminut kurpitsahillo poistettiin PCA:sta (kuva 34).



Kuva 33. Mansikkahillon (punainen n, M.hillo) ja kurpitsahillon (vihreä l, K.hillo) sekä 5–50 % kurpitsaa sisältävien väärennösmanikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja kurpitsahillosta (K) erilaisina lisäyksinä: 5 % kurpitsaa (sininen •, M+K 5 %), 10 % kurpitsaa (violetti u, M+K 10 %), 20 % kurpitsaa (pinkki , M+K 20 %) ja 50 % kurpitsaa (oranssi Ö, M+K 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 42 % ja PC2 23 %.

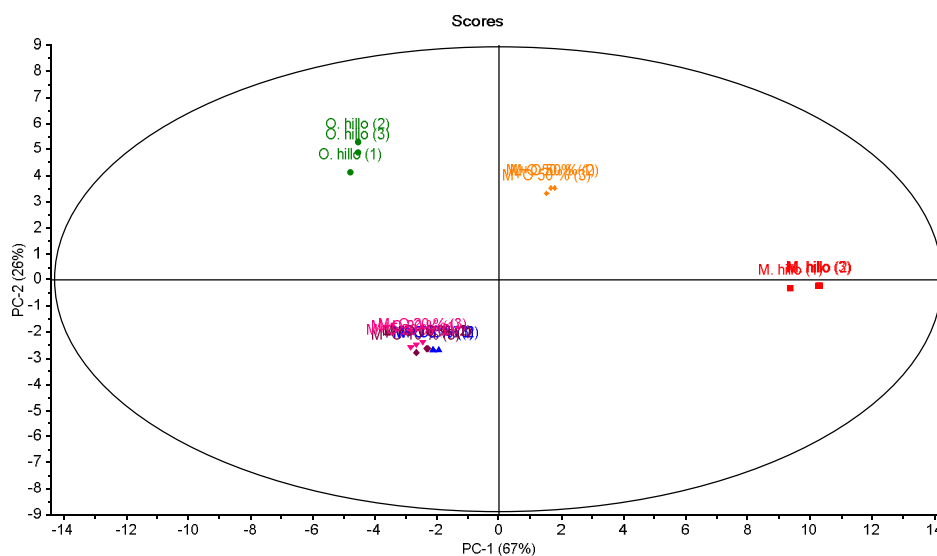


Kuva 34. Mansikkahillon (punainen n, M.hillo) ja 5–50 % kurpitsaa sisältävien väärennösmanikkahillojen aromikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja kurpitsahillosta (K) erilaisina lisäyksinä: 5 % kurpitsaa (sininen l, M+K 5 %), 10 % kurpitsaa (violetti •, M+K 10 %), 20 % kurpitsaa (pinkki u, M+K 20 %) ja 50 % kurpitsaa (oranssi , M+K 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 37 % ja PC2 24 %.

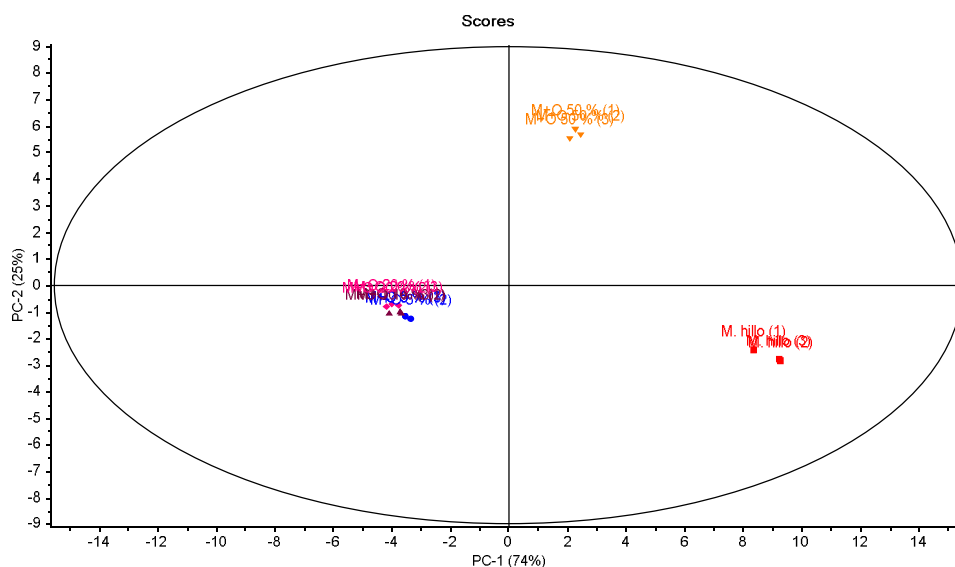
3.4.7 Väärentämisen havaitseminen hillon fenolisten yhdisteiden perusteella

3.4.7.1 Mansikka- ja omenahillo sekä niiden seokset

Omenahillo erottui fenolisten yhdisteiden koostumuksensa perusteella selvästi mansikkahillon fenolikoostumuksesta, mikä selitti 67 % kokonaisvaihtelusta (kuva 35). Myös mansikkahillot, joihin oli lisätty 5 %, 10 %, 20 % tai 50 % omenahilloa, erottuivat sekä mansikka- että omenahillosta. Ero oli selkeä myös silloin, kun vertailuhillona toiminut omenahillo poistettiin PCA:sta (kuva 36).



Kuva 35. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo) ja omenahillon (vihreä \square , O.hillo) sekä 5–50 % omenaa sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja omenahillosta (O) erilaisina lisäyksinä: 5 % omenaa (sininen \bullet , M+O 5 %), 10 % omenaa (violetti \square , M+O 10 %), 20 % omenaa (pinkki \square , M+O 20 %) ja 50 % omenaa (oranssi \square , M+O 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 67 % ja PC2 26 %.

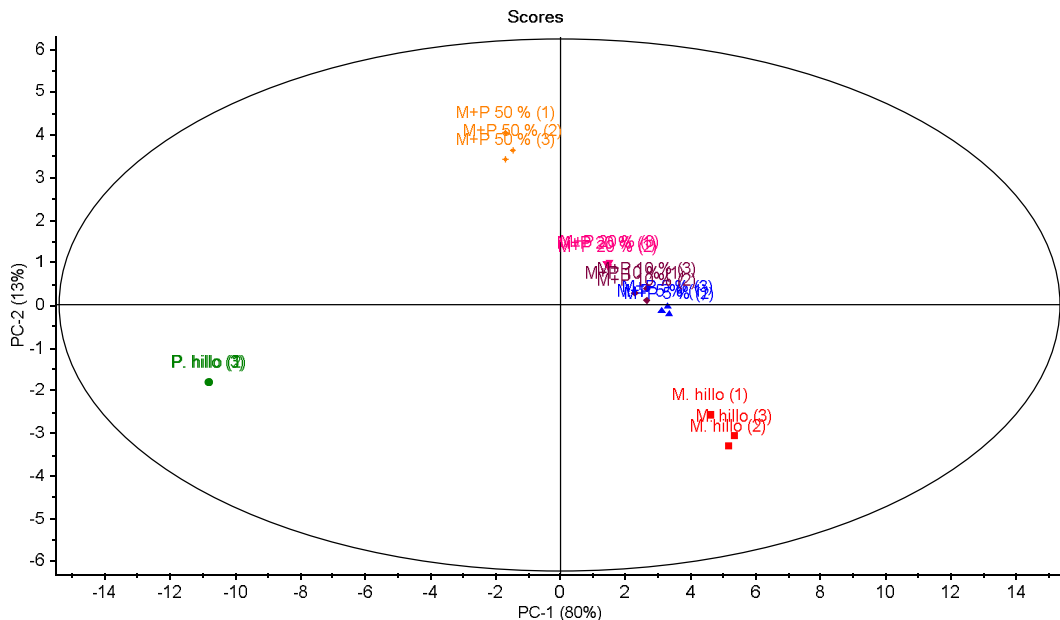


Kuva 36. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo) ja 5–50 % omenaa sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja omenahillosta (O) erilaisina lisäyksinä: 5 % omenaa (sininen \square , M+O 5 %), 10 % omenaa (violetti \bullet , M+O 10 %), 20 % omenaa (pinkki \square , M+O 20 %) ja 50 % omenaa (oranssi \square , M+O 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 74 % ja PC2 25 %.

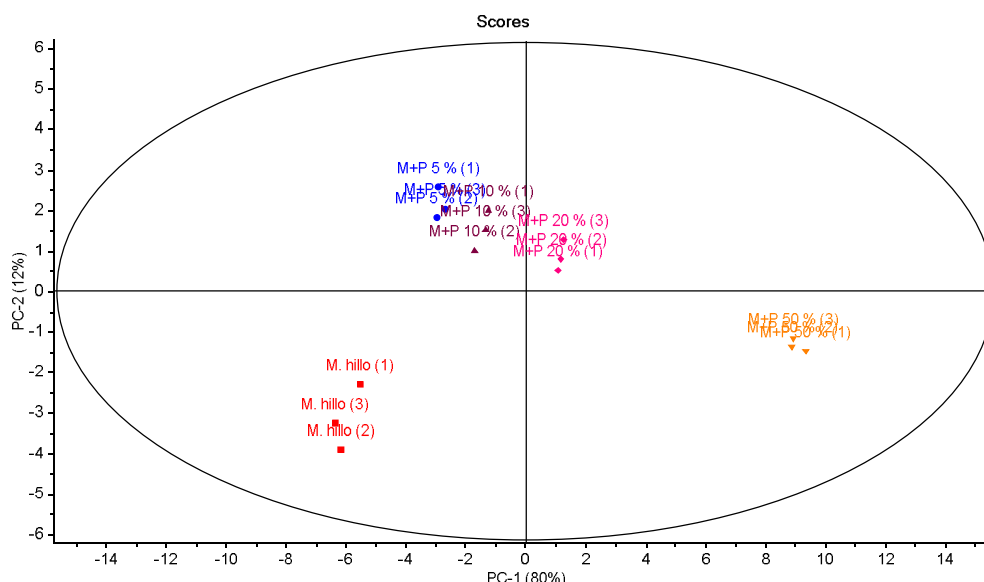
Muista tuloksista poiketen 50 % omenahilloa sisältäneen mansikkahillon fenolikoostumus muistutti kuvaajan perusteella enemmän puhtaan mansikkahillon fenolikoostumusta kuin 5–20 % omenaa sisältäneiden mansikkahillojen fenolikoostumusta, vaikka nämä sisälsivät suhteessa enemmän mansikkahilloa. Seos, jossa oli 50 % omenaa erottui kuvaajassa selvemmin muista seoksista, kun taas 5–20 % omenaa sisältäneiden väärennösten tulokset sekoittuvat keskenään.

3.4.7.2 Mansikka- ja päärynähillo sekä niiden seokset

Päärynähillo erottui fenolisten yhdisteiden koostumuksensa perusteella selvästi mansikkahillon fenolisten yhdisteiden koostumuksesta (kuva 37). Tämä selitti jo 80 % kokonaisvaihtelusta. 5–50 % päärynähilloa sisältäneiden mansikkahillojen fenolikoostumukset olivat poikkeavia verrattuna sekä mansikka- että päärynähilloon. 50 % päärynähilloa sisältänyt hillo oli eniten poikkeavin, mikä selitti 13 % kokonaisvaihtelusta. 5–20 % päärynää sisältäneet väärennöshillot erottuivat toisistaan selkeämmin kuin 5–20 % omenaa sisältäneet vastaavat seokset. Ero puhtaan mansikkahillon ja päärynällä jatkettujen mansikkahillojen välillä oli selkeä myös silloin, kun vertailuihilloina toiminut päärynähillo poistettiin PCA:sta (kuva 38).



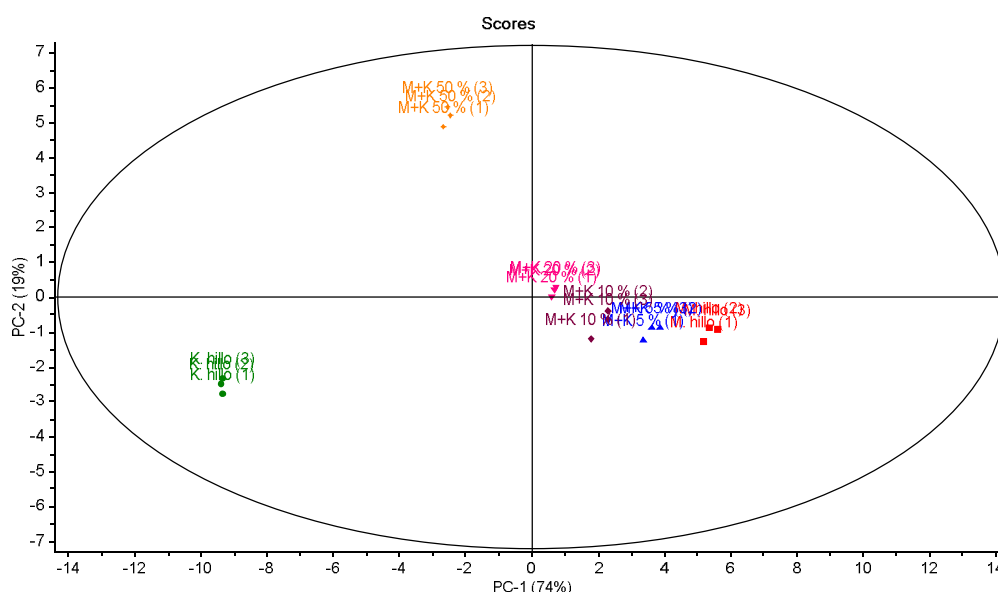
Kuva 37. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo) ja päärynähillon (vihreä \bullet , P.hillo) sekä 5–50 % päärynää sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja päärynähillosta (P) erilaisina lisäyksinä: 5 % päärynää (sininen \bullet , M+P 5 %), 10 % päärynää (violetti \square , M+P 10 %), 20 % päärynää (pinkki \cdot , M+P 20 %) ja 50 % päärynää (oranssi \circ , M+P 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 80 % ja PC2 13 %.



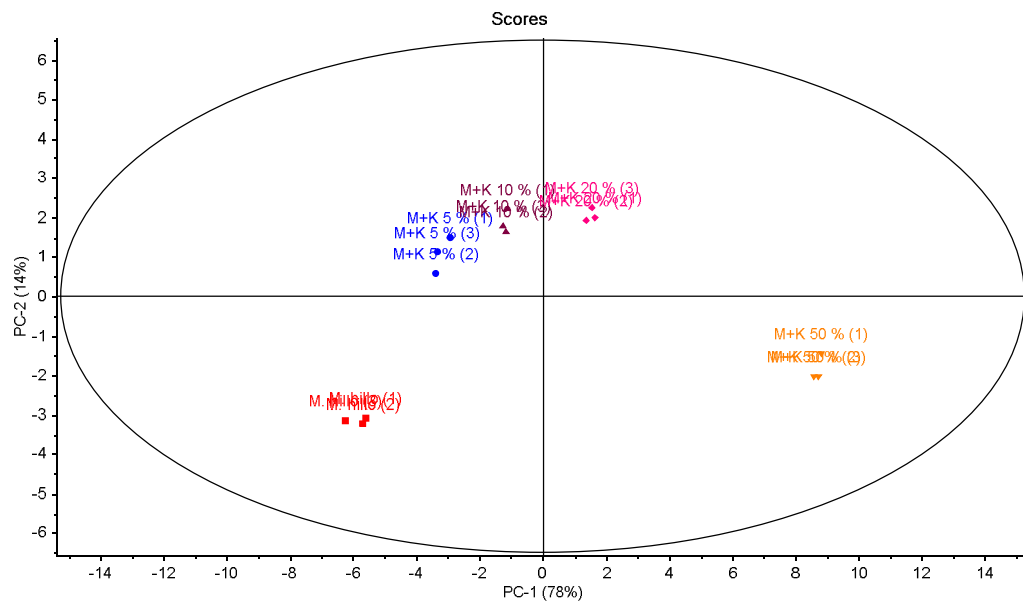
Kuva 38. Mansikkahillon (punainen ■, M.hillo) ja 5–50 % päärynää sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja päärynähillosta (P) erilaisina lisäyksinä: 5 % päärynää (sininen □, M+P 5 %), 10 % päärynää (violetti •, M+P 10 %), 20 % päärynää (pinkki ◐, M+P 20 %) ja 50 % päärynää (oranssi ◑, M+P 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 80 % ja PC2 12 %.

3.4.7.3 Mansikka- ja kurpitsahillo sekä niiden seokset

Kurpitsahillo erottui fenolikoostumuksensa perusteella selvästi mansikkahillon fenolikoostumuksesta, mikä selitti jo 74 % kokonaisvaihtelusta (kuva 39). Mansikkahillo, jotka sisälsivät 5–50 % kurpitsaa, erosivat myös sekä mansikka- että kurpitsahillosta. Kuvaajan perusteella 5–20 % kurpitsahilloa sisältäneet hilloväärennökset eivät eronneet kovin paljon mansikkahillosta. Ero mansikkahillon ja väärennöshillojen välillä oli selkeämpi silloin, kun vertailuhillona toiminut kurpitsahillo poistettiin PCA:sta (kuva 40).



Kuva 39. Mansikkahillon (punainen ■, M.hillo) ja kurpitsahillon (vihreä □, K.hillo) sekä 5–50 % kurpitsaa sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja kurpitsahillosta (K) erilaisina lisäyksinä: 5 % kurpitsaa (sininen •, M+K 5 %), 10 % kurpitsaa (violetti ◐, M+K 10 %), 20 % kurpitsaa (pinkki ◑, M+K 20 %) ja 50 % kurpitsaa (oranssi ◒, M+K 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 74 % ja PC2 19 %.

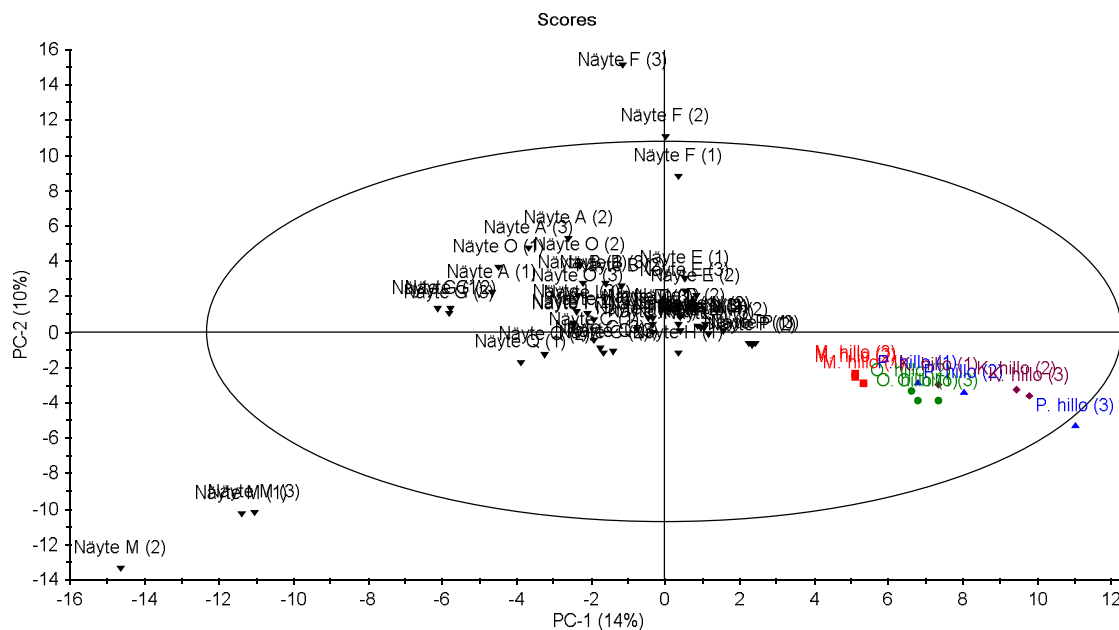


Kuva 40. Mansikkahillon (punainen □, M.hillo) ja 5–50 % kurpitsaa sisältävien väärennösmanikkahillojen fenolikoostumuksen PCA. Väärennökset koostuivat mansikkahillosta (M) ja kurpitsahillosta (K) erilaisina lisäyksinä: 5 % kurpitsaa (sininen □, M+K 5 %), 10 % kurpitsaa (violetti •, M+K 10 %), 20 % kurpitsaa (pinkki □, M+K 20 %) ja 50 % kurpitsaa (oranssi □, M+K 50 %). Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 78 % ja PC2 14 %.

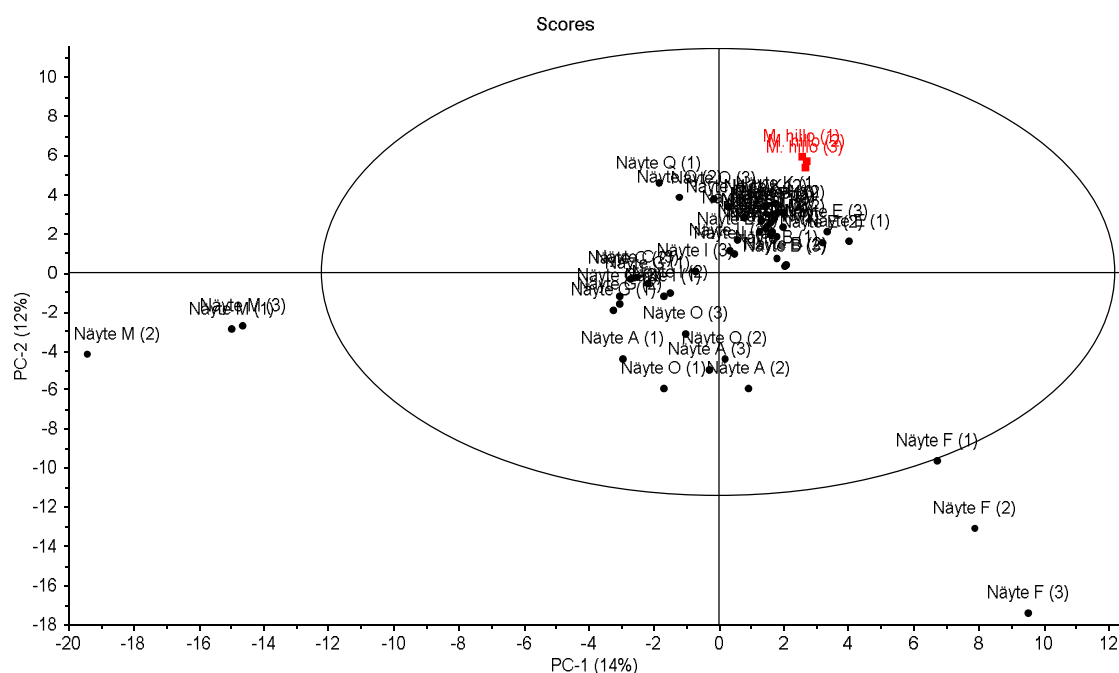
3.4.8 Kaupallisten hillotuotteiden tarkastelu

3.4.8.1 Aromikoostumuksen erot

17 tavallista kaupallista mansikkatuotetta (näytteet A-Q) määritettiin kolmena rinnakkaisena näytteenä. Verrattaessa kaupallisia näytteitä itse tehtyihin mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloihin, muutama rinnakkainen näyte jäi ääriarvoja seulovan Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolelle (kuva 41). Ulkopuolelle jääneet näytteet (kaikki näytteen M rinnakkaiset, kaksi näytteen F rinnakkaista sekä yksi rinnakkainen päärynähillosta) saattoivat olla joko ääriarvoja tai erottua näytejoukosta muista syistä. Kahta poikkeavaa kaupallista näytettä M ja F tarkasteltiin tarkemmin, vaikka kahden ensimmäisen pääkomponentin yhteenlaskettu selitysaste kokonaisvaihtelusta oli vain 24 %. Koska itse tehty päärynähillo sekä omena- ja kurpitsahillo olivat lähtökohtaisesti eri raaka-aineesta tehty, kaupallisten näytteiden aromikoostumusta verrattiin myös pelkästään itse tehdyn mansikkahillon aromikoostumukseen (kuva 42). Myös tässä vertailussa näytteet M ja F erottuivat muiden kaupallisten näytteiden joukosta poikkeavina näytteinä tai mahdollisina ääriarvoina (PC1 + PC2 26 % kokonaisvaihtelusta). Näytteet M ja F poikkesivat aromikoostumukseltaan myös itse tehdystä mansikkahillosta enemmän kuin muut kaupalliset näytteet.



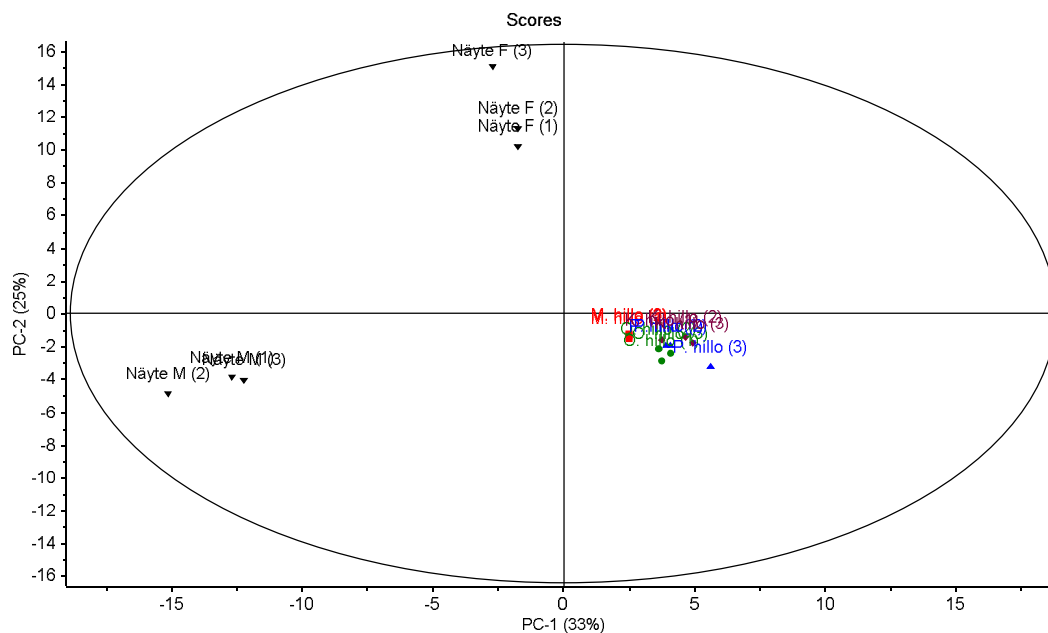
Kuva 41. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo), omenahillon (vihreä \triangle , O.hillo), päärynähillon (sininen \bullet , P.hillo) ja kurpitsahillon (violetti \square , K.hillo) sekä kaupallisten näytteiden A-Q (musta \cdot , , Näyte A-Q) aromikoostumuksen PCA. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 14 % ja PC2 10 %.



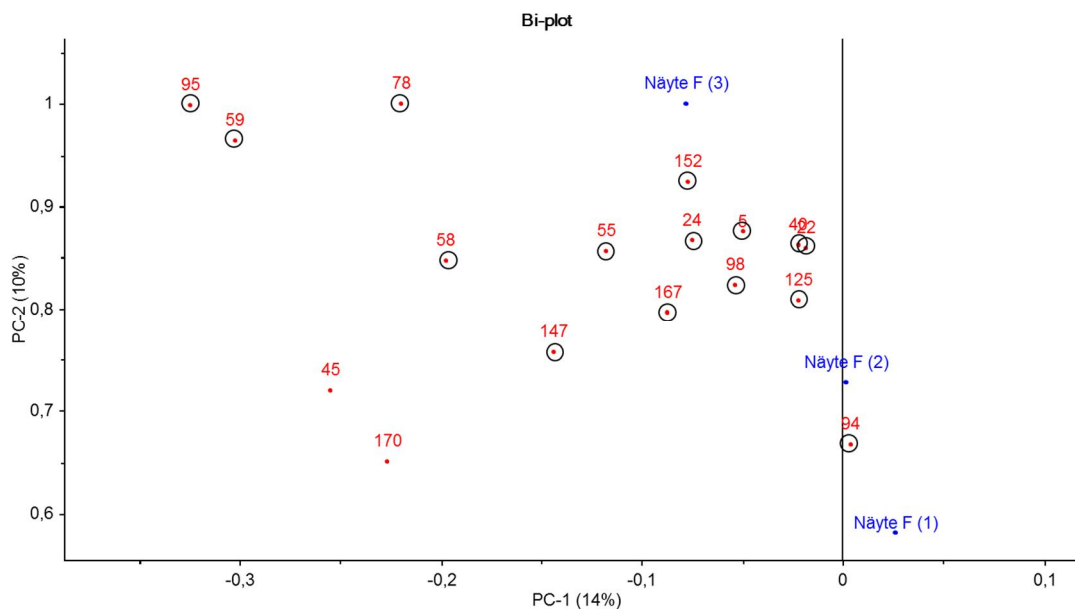
Kuva 42. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo) ja kaupallisten näytteiden A-Q (musta \cdot , , Näyte A-Q) aromikoostumuksen PCA. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 14 % ja PC2 12 %.

Kahta poikkeavaa näytettä verrattiin myös pelkästään itse tehtyihin hilloihin (muut kaupalliset näytteet pois lukien) (kuva 43). Näytteet M ja F sijoittuvat Hotelling T^2 -ympyrän sisään, eli eivät olleet itse tehtyihin hilloihin nähden ääriarvoja (PC1 + PC2 58 % kokonaisvaihtelusta). Tämä vertailu vahvisti havaintoa, että kahden kaupallisen näytteen aromikoostumus oli poikkeava itse tehtyihin hilloihin nähden. Näyte M:n ja F:n aromikoostumukset olivat PCA:n perusteella hyvin erilaisia itse tehtyjen hillojen

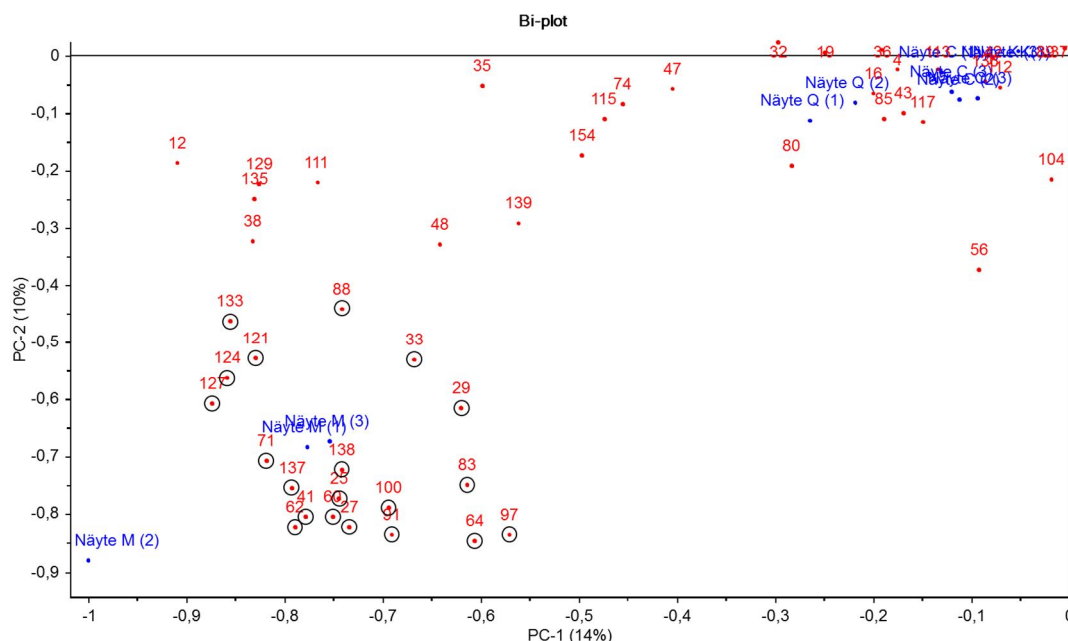
aromiprofiileihin verrattuna. Kaupallisille näytteille M ja F tyypillisiä yhdisteitä tarkasteltiin lisäksi lähemmin yhdistetyn Bi-plot-kuvaajan avulla (kuvat 44 ja 45).



Kuva 43. Mansikkahillon (punainen \circ , M.hillo), omenahillon (vihreä \bullet , O.hillo), päärynähillon (sininen \bullet , P.hillo) ja kurpitsahillon (violetti \bullet , K.hillo) sekä kaupallisten näytteiden M ja F (musta Δ , \circ , Näyte M tai F) aromikoostumuksen PCA. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 33 % ja PC2 25 %.



Kuva 44. Itse tehtyjen hillonäytteiden ja kaupallisten näytteiden aromikoostumuksen PCA:n Bi-plot-kuvaaja. Lähikuvassa näkyy näytelle F tyypilliset yhdisteet (punaiset, mustalla ympäröidyt numerot) ja alustava tunnistus: 5) 2-metyylibutaanihappo, 22) Z-cis-3-heksenyylisetaatti, 24) heksyylisetaatti, 40) isoamyli-isovaleraatti, 55) ei tunnistusta, 58) metyyliisylisylaatti, 59) dekanaali, 78) ei tunnistusta, 94) E-2-oktenaali, 95) ei tunnistusta, 98) metyylikinnamaatti, 125) jokin naftaleeni, 147) ei tunnistusta, 152) ei tunnistusta, 167) ei tunnistusta. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). Pääkomponenttien selitysasteet ovat samat kuin kuvassa 41.

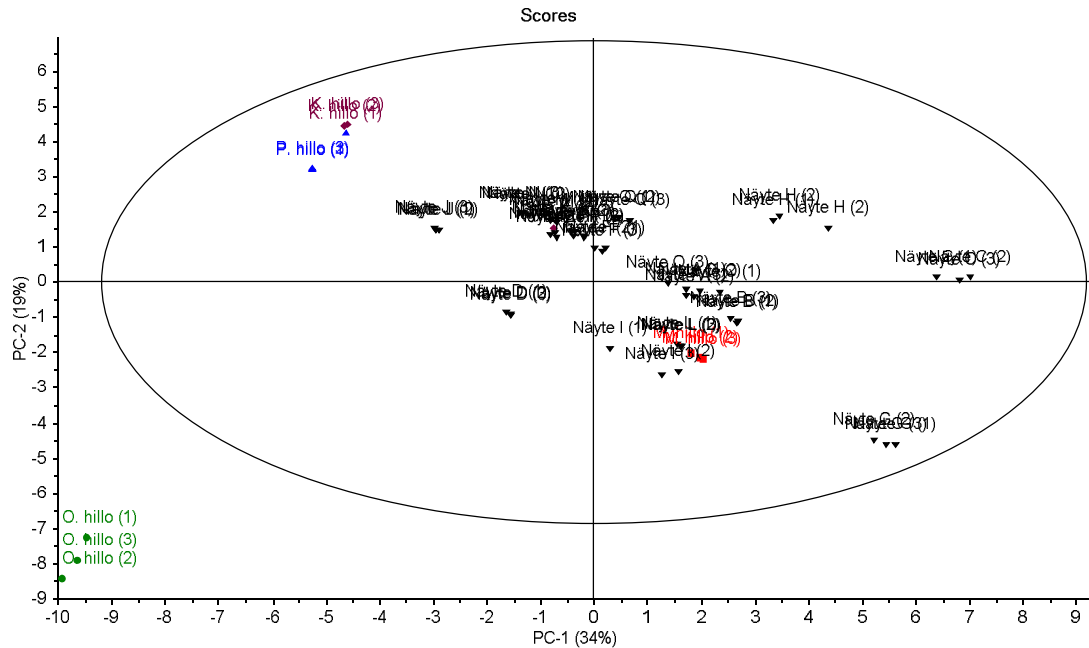


Kuva 45. Itse tehtyjen hillonäytteiden ja kaupallisten näytteiden aromikoostumuksen PCA:n Bi-plot-kuvaaja. Lähikuvassa näkyy näytelle M tyypilliset yhdisteet (punaiset, mustalla ympyröidyt numerot) ja alustava tunnistus: 25) trans-2-heksenyliasettaatti, 27) 1-metyyli-2-propyylibentseeni, 29) 1,8-sineoli, 33) α -linalooli, 41) metyylioktanoaatti, 60) oktyyliasettaatti, 62) α -ioneni tai muu naftaleeni, 64) ei tunnistusta, 71) ei tunnistusta, 83) α -terpineoli, 88) metyyliidekanoaatti, 91) 1,2,3-propaanitriolidiasetaatti, 97) heksyyliheksanoaatti, 100) etyyliidekanoaatti, 121) ei tunnistusta, 124) ei tunnistusta, 127) jokin furaani tai naftaleeni, 133) α -bisaboloni 137) amyliheksanoaatti, 138) ei tunnistusta. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). Pääkomponenttien selityssasteet ovat samat kuin kuvassa 41.

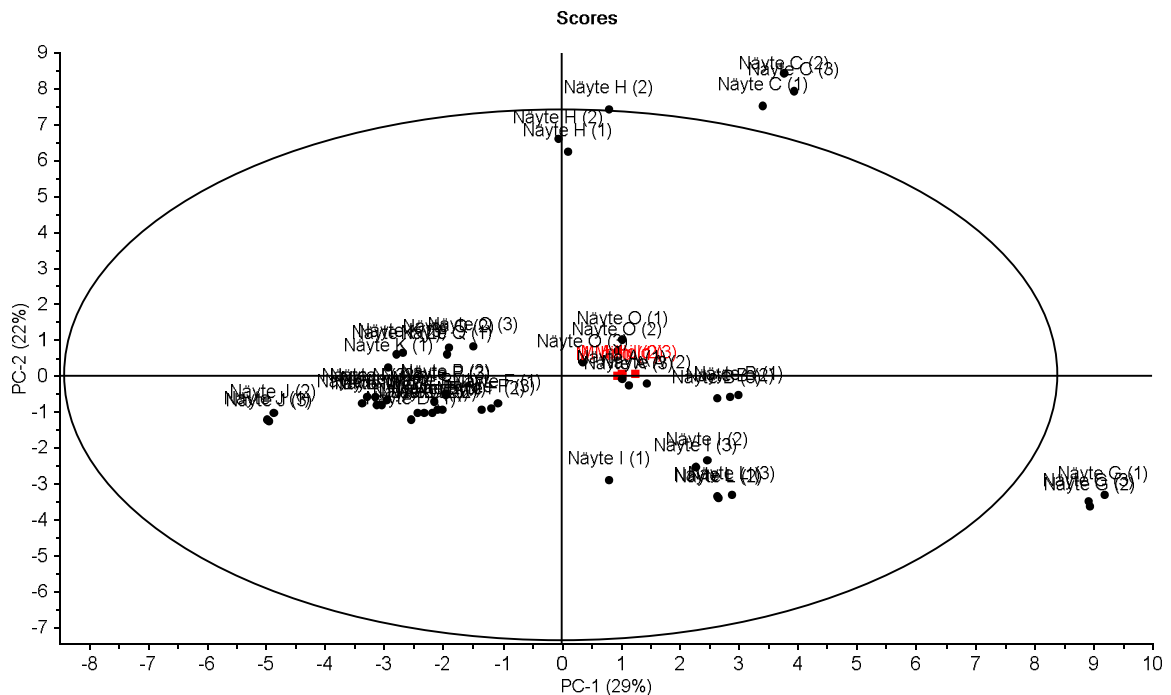
3.4.8.2 Fenolikoostumuksen erot

Kaupallisia näytteitä (A-Q) verrattiin itse tehtyihin mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloihin myös fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella (kuva 46). Hilloille tyypillisten fenolisten yhdisteiden perusteella omena-, päärynä- ja kurpitsahillo erottuivat eniten muista näytteistä. Näistä omenahillo erottui eniten (jäi Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolelle). Kahden ensimmäisen pääkomponentin selityssaste kokonaisvaihtelusta oli yhteensä 53 %. PCA-vertailussa käytettiin kuitenkin vain itse tehdyille mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloille tyypillisiä yhdisteitä, mikä rajoittaa tulosten tarkastelua. Vain kaupallisille näytteille tyypilliset yhdisteet eivät olleet mukana vertailussa. Vertailun perusteella voitiin kuitenkin todeta, että kaupallisten näytteiden fenolisten yhdisteiden koostumus oli silti poikkeava omena-, päärynä- ja kurpitsahillojen yhdisteisiin verrattuna. Lisäksi vertailtiin, erottuivatko kaupalliset näytteet itse tehdystä mansikkahillosta vain mansikalle tyypillisten fenolisten yhdisteiden perusteella (kuva 47). Tässä vertailussa muusta joukosta eniten erottuivat näytteet H, C ja G (mahdollisia ääriarvoja, sillä jäivät Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolelle). Kahden ensimmäisen pääkomponentin yhteenlaskettu selityssaste kokonaisvaihtelusta oli 51 %. Sillä näyte G oli sosemainen näyte ja muut hilloja, poistettiin näyte G PCA:sta (kuva 48). Tällöin näyte C jäi edelleen Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolelle ja näyte H lähelle

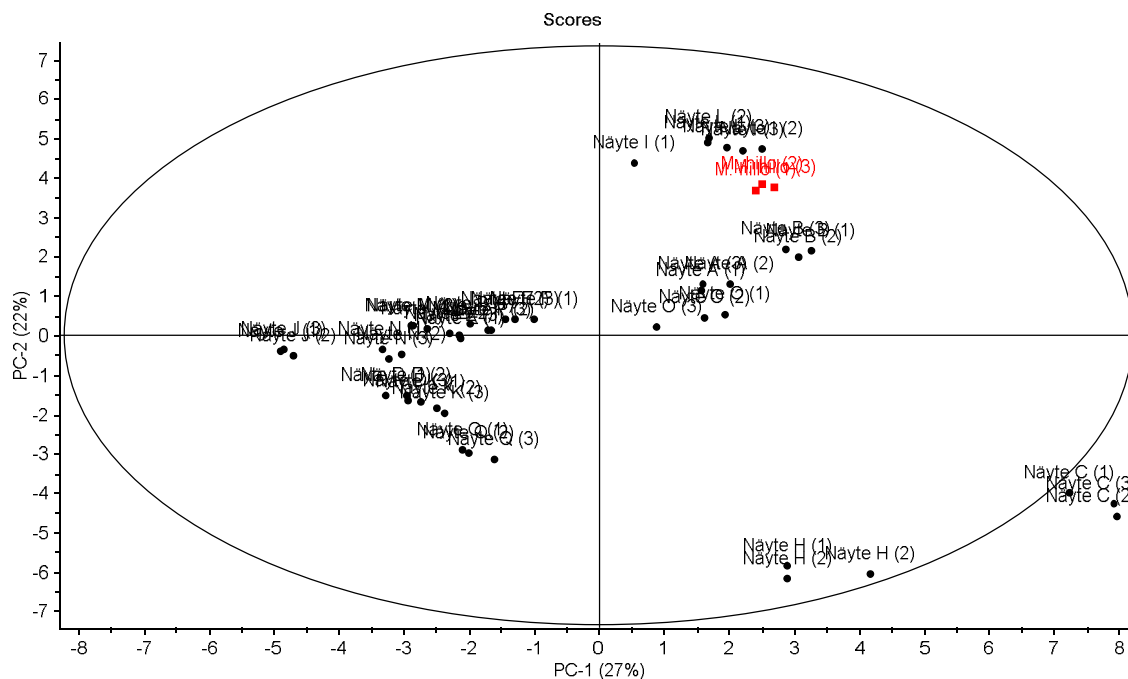
ääriarvojen rajaa. Kahden ensimmäisen pääkomponentin yhteenlaskettu selityssaste kokonaisvaihtelusta oli tällöin 49 %. Kuvaajasta voitiin päätellä, että näytteiden C ja H fenolisten yhdisteiden koostumus poikkesi itse tehdyn mansikkahillon fenolisten yhdisteiden koostumuksesta.



Kuva 46. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo), omenahillon (vihreä \square , O.hillo), päärynähillon (sininen \bullet , P.hillo) ja kurpitsahillon (violetti \square , K.hillo) sekä kaupallisten näytteiden A-Q (musta \square , , Näyte A-Q) PCA itse tehdyille hilloille tyypillisten fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 34 % ja PC2 19 %.



Kuva 47. Mansikkahillon (punainen \square , M.hillo) ja kaupallisten näytteiden A-Q (musta \square , , Näyte A-Q) PCA itse tehdyille mansikkahilloille tyypillisten fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 29 % ja PC2 22 %.



Kuva 48. Mansikkahillon (punainen □, M.hillo) ja kaupallisten näytteiden A-Q (musta ●, , Näyte A-Q) PCA itse tehdyllä mansikkahilloille tyypillisten fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella, poislukien näyte G. Kussakin näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä (1-3). PC1 selitti kokonaisvaihtelusta 27 % ja PC2 22 %.

3.4.9 Yhteenveto tuloksista

Kiinnostavana löytönä mansikkahillonäytteistä havaittiin pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteenä pidettyä floritsiinia sekä floretiiniksyloglukosidia. Aromiyhdisteiden määritysmenetelmän toistokokeiden RSD oli huomattavasti suurempi kuin fenolisten yhdisteiden määritysmenetelmässä (51 % vs. 10 %). Fenolisten yhdisteiden koostumusta vertailevien pääkomponenttianalyysien yhteenlasketut selitysasteet kokonaisvaihtelusta (PC1+PC2) olivat myös huomattavasti suurempia kuin aromiyhdisteiden koostumusta vertailevat PCA:t (taulukko 10). Itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat toisistaan selkeinä ryhminä sekä aromi- että fenolikoostumuksen perusteella. Mansikka- sekä omena-, päärynä- ja kurpitsahilloista tehty väärennöshillot erottuivat kaikista puhtaista hilloista sekä aromiyhdisteiden että fenolisten yhdisteiden määrittelyn perusteella. Väärennöshillot sisälsivät väärentävää raaka-ainetta 5–50 %. Erot mansikkahillon ja väärennöshillojen välillä olivat selkeät myös silloin, kun vertailuhillona toiminut omena-, päärynä- tai kurpitsahillo poistettiin PCA:sta. 50 % väärentävää raaka-ainetta sisältäneet hillot erottuivat selvästi muista väärennösseoksista kaikilla raaka-aineilla. Näytteiden välisiä eroja oli huomattavasti hankalampi havaita mansikkahilloissa, joita oli jatkettu 5–20 % toisella raaka-aineella.

Taulukko 10. Kooste tulosaineiston pääkomponenttianalyysien selityksistä (PC1, PC2 ja yhteenlaskettu PC1+PC2 %). M=mansikka, O=omena, P=päärynä ja K=kurpitsa.

Näyte	Aromikoostumuksen PCA:t			Fenolikoostumuksen PCA:t		
	PC1 %	PC2 %	PC1+PC2 %	PC1 %	PC2 %	PC1+PC2 %
M.hillo + M.ose	57	17	73	93	5	98
M.hillo + O.hillo + P.hillo + K.hillo	34	29	63	59	29	88
M.hillo + O.hillo + M+O 5–50 %	47	15	62	67	26	93
M.hillo + M+O 5–50 %	36	19	55	74	25	99
M.hillo + P.hillo + M+P 5–50 %	37	22	59	80	13	93
M.hillo + M+P 5–50 %	36	22	58	80	12	92
M.hillo + K.hillo + M+K 5–50 %	42	23	66	74	19	93
M.hillo + M+K 5–50 %	37	24	61	78	14	92
M.hillo + O.hillo + P.hillo + K.hillo + kaupalliset näytteet	14	10	24	34	19	53
M.hillo + kaupalliset näytteet	14	12	26	29	22	51

Muutama rinnakkainen näyte poikkesi muusta näytejoukosta verrattaessa kaupallisten näytteiden aromi- ja fenolikoostumuksia itse tehtyjen mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillojen koostumuksiin. Aromikoostumuksen perusteella poikkeavat näytteet olivat kaupalliset näytteet M ja F, kun taas fenolikoostumuksen perusteella poikkeavat näytteet olivat kaupalliset näytteet C ja H. Vain kaupallisille näytteille tyypilliset fenoliset yhdisteet eivät kuitenkaan olleet mukana fenolikoostumusten PCA-vertailussa, mikä rajoittaa tulosten tarkastelua siltä osin.

3.5 POHDINTA

3.5.1 Näytevalinnat

Tutkimuksen raaka-aineiksi valittiin kilohinnaltaan halvinta hedelmälaajiketta. Tämä oli perusteltua, sillä väärennöstä aikova tekijä ei oletettavasti valitsisi kalliimpaa laajiketta, jos halvempiakin lajikkeita olisi saatavilla. Esimerkiksi Ida Red -lajikkeen omenat maksoivat Suomessa ostohetkellä 0,75 €/kg kun Granny Smith -lajikkeen omenat maksoivat 1,65 €/kg. Lisäksi riskinarvioperusteisesti oli perusteltua valita Puolasta tuotu omenalajike (Ida Red), sillä Puolassa tuotetaan paljon tuoretta mansikkaa teollista käyttöä varten sekä valmistetaan mansikkatuotteita (EU raportti 2006). Kurpitsahillon raaka-aineeksi miedomman hajuinen ja makuinen kesäkurpitsa olisi ollut myskikurpitsaa parempi valinta, koska se olisi ollut todennäköisempi materiaali väärennöskäyttöön (Dragovic-Uzelac ym. 2005). Tutkimuksen toteutushetkellä Butternut-myskikurpitsat olivat kuitenkin ainoat saatavilla olleet tuorekurpitsat, joista tiedettiin lajike. Oleellista näytevalintojen kannalta oli myös se, että kasvien eri lajikkeesta johtuvaa koostumuksen vaihtelua ei aikataulurajoitusten vuoksi voitu tässä työssä ottaa huomioon. Kaupallisissa näytteissä käytettyjä lajikkeita ei myöskään ollut tiedossa, joten kaupallisten näytteiden vertailu itse tehtyihin hilloihin oli vain suuntaa antavaa.

3.5.2 Menetelmät

3.5.2.1 SPME-GC-MS-menetelmän esikokeet

Työssä aromiyhdisteiden määrittämenetelmänä käytettiin SPME-GC-MS-tekniikkaa. Vertaillut SPME-kuidut olivat pooliton 100 µm:n PDMS-kuitu ja bi-polaarinen 75 µm:n CAR-PDMS-kuitu. 100 µm:n PDMS-kuitua on käytetty aikaisemmissakin mansikan aromiyhdisteiden tutkimuksissa (Reid ym. 2004; Williams ym. 2005). 100 µm:n PDMS-kuidun paksumpi filmi soveltuu parhaiten haihtuvien aromiyhdisteiden keräämiseen, jotka ovat molekyylipainoltaan noin 60–275 g/mol (Sigma-Aldrich 2015). Sitä voidaan käyttää myös vähemmän haihtuvien yhdisteiden uuttumiseen, jolloin tarvitaan pidempi uuttumisaika. 75 µm:n CAR-PDMS-kuidun huokoinen filmi on puolestaan ideaalinen pienten, molekyylipainoltaan ≤ 225 g/mol kokoisten (C2-C6), poolisten haihtuvien yhdisteiden keräilyyn. Pooliset analyytit kiinnittyvät poolisiin faaseihin (esimerkiksi polyakrylaatti- ja karbokseeni-päällysteet). Tulokset olivat siten odotettuja, kun muun muassa mansikalle tyypillinen aromiyhdiste E-nerolidoli (molekyylipaino 222,37 g/mol) uuttui paremmin 100 µm:n PDMS-kuidulla kuin 75 µm:n CAR-PDMS-kuidulla.

PDMS-kuidun lisäksi uudemmissa tutkimuksissa on käytetty myös 65 µm:n bi-polaarista PDMS-DVB-kuitua (Boishebert ym. 2006; Ravid ym. 2009) sekä 50/30 µm:n PDMS-CAR-DVB-kuitua (Schillipiti ym. 2011). Alun perin tässä työssä tarkoituksena oli vertailla 100 µm:n PDMS-kuitua 50/30 µm:n PDMS-CAR-DVB-kuituun, mutta tätä kuitua ei saatu testaukseen. Huokoiset kuidut (karbokseeni- ja divinyylibentseeni-päällysteet) voivat kerätä myös pienikokoisia määritettäviä yhdisteitä. Ohuemman filmin kuidut (7 µm:n ja 30 µm:n PDMS) ovat puolestaan parempia isommille molekyyleille (Sigma-Aldrich 2015). Olisi ollut mielenkiintoista testata, kuinka paljon eroa yhdisteiden uuttumisessa kolmea faasimateriaalia yhdistävällä 50/30 µm:n PDMS-CAR-DVB-kuidulla olisi tullut 100 µm:n PDMS-kuituun verrattuna. PDMS-CAR-DVB-kuidulla olisi voitu havaita kaikista laajin määrä erilaisia aromiyhdisteitä. Schillipiti ym. (2011) valitsivat tutkimukseensa PDMS-CAR-DVB-kuidun, että aromiyhdisteiden uuttuminen mansikkänäytteestä olisi mahdollisimman monipuolista. Reidin ym. (2004) tutkimuksessa käytettiin onnistuneesti myös 100 µm:n PDMS-kuitua mansikkasoseen ja omenalla jatkettujen mansikkaseosten aromiyhdisteiden määrittämissä.

Kromatogrammeissa havaittiin jatkuvasti häiriöpiikkejä, mutta tätä ei manuaalisessa SPME:ssä voida täysin estää. Monet määritetyistä aromiyhdisteistä retentoituivat leveinä piikkeinä. Tutkimuksen aikana oli tarkoitus kokeilla myös kapeampaa 0,75 mm:n

tuloaukon tiivistettä (SUPELCO for SPME-GC inlet liner) nyt käytetyn 1,8 mm:n tiivisten sijaan. Koska 0,75 mm:n tiivisteessä on pienempi höyrystymistilavuus, piikeistä tulee terävämpiä. Tätä voisi kokeilla jatkotutkimuksissa. Kapeammalla tiivisteellä muiden nestemäisten näytteiden määrittäminen olisi kuitenkin ollut hankalaa, koska yhdisteet eivät välttämättä mahdu höyrystymään tiivisteeseen tilavuudessa. Käytössä olleella laitteella tehtiin jatkuvasti myös muita analyyskejä, joten tiivisteiden vaihtaminen määrittämisväleissä olisi ollut työlästä.

Käytössä ollut GC-kolonne (5-prosenttinen fenyyli-metyylipolysiloksaani) ei myöskään ollut paras mahdollinen kolonne aromiyhdisteiden määrittämiseen. Pooliton kolonne erottaa parhaiten poolittomia yhdisteitä ja poolinen kolonne puolestaan poolisia yhdisteitä. Poolitonta 5-prosenttista fenyyliä vastaavassa faasissa yhdisteet eluoituvat kiehumispisteen mukaisessa järjestyksessä. Kolonnen ominaisuudet, kuten hyvä signaali-kohina-suhte, selektiivisyys, herkkyys, reagoimattomuus aktiivisten happo- ja emäsyhdisteiden kanssa sekä kestävyys tekevät kyseisestä kolonnista hyvän vaihtoehdon muun muassa poolittomille ympäristönäytteille (esim. keskihaihtuvat yhdisteet, pestisidit, PCB:t ja herbisidit). 5-prosenttiset fenyyli-metyylipolysiloksaanikolonnit ovat poolittomia yleiskolonneja hiilivetyjen analysointiin ja siten laboratorion kannalta käytännöllisiä, sillä samalla laitteella määritetään usein monenlaisia näytteitä. Vastaavaa kolonnaa on käytetty aromiyhdisteiden määrittämisessä esimerkiksi Zhangin ym. (2011) ja Schipillitin ym. (2011) tutkimuksissa.

Muita kolonnivaihtoehtoja aromiyhdisteiden määrittämiseen olisivat esimerkiksi kolonnit, joissa on paksumpi filmi. Ne soveltuvat hyvin analyyteille, joilla on matala kiehumispiste, kuten haihtuville orgaanisille yhdisteille. Tämän tyyppiset analyytit pidättäytyvät paksummassa filmissä pidempään, mikä voi vähentää alhaisempien uunin lämpötilojen käytön tarvetta. Paksummalla filmillä on myös parempi kapasiteetti, minkä vuoksi kolonnilla voidaan määrittää suurempia pitoisuuksia kuin ohuemmilla filmeillä. Toinen vaihtoehto olisi poolisella karbokseeni-faasilla päällystetyt kolonnit (esim. Carbowax 20M). Poolinen yleiskolonne soveltuu mm. liuottimien, rasvahappojen, elintarvikenäytteiden, alkoholien sekä aromiyhdisteiden määrittämiseen. SPME:n yhdistäminen lyhyeseen ja kapeaan kapillaarikolonnein (esim. 10 m x 0.20 mm x 1.20 µm) voi suurentaa päivän aikana ehdittävien määrittämisväleiden lukumäärää. Myös kiraaliset kapillaarikolonnit voivat olla hyödyllisiä aromiyhdisteiden enantiomeeristen muotojen määrittämisessä. Monet mansikan aromiyhdisteistä ovat kiraalisia yhdisteitä ja voivat esiintyä raseemisina seoksina tietyssä enantiomeerisuhteessa. Enantiomeerisuhteita on

käytetty onnistuneesti myös mansikkaa sisältävien tuotteiden aitouden tutkimisessa (Ravid ym. 2009).

3.5.2.2 UHPLC-MS-menetelmän esikokeet

Uuttomenetelmä

Ultraääniuutto oli kiinteä-nesteuuttoa nopeampi ja yksinkertaisempi menetelmä sekä sen avulla fenolisia yhdisteitä uuttui monipuolisemmin. Liuotinuutossa fenolisten yhdisteiden uuttuminen voikin jäädä epätäydelliseksi (Kammerer ym. 2012). Nykyisin yleisemmin käytetään esimerkiksi ultraääniuuttoa. Ultraääniuutto on edullinen menetelmä, koska uuttoaika ultraäänihauteessa on lyhyt ja uuttoon tarvittavan orgaanisen liuottimen määrä pieni. Esimerkiksi Aaby ym. (2007a ja 2012) käyttivät onnistuneesti ultraäänihaudetta fenolisten yhdisteiden uutossa. Fenolisten yhdisteiden ultraääniuutto onnistui myös tässä työssä. Mikäli hillonäyte haluttaisiin puhdistaa sokereista tai isokokoisemmista polymeerisistä fenolisista yhdisteistä, SPE:n käyttöä voisi harkita ultraääniuuton esikäsitteilyksi.

UHPLC-MS

Fenoliset yhdisteet määritettiin UHPLC-MS-tekniikalla. UHPLC-MS-määrityksen olosuhteet ja gradientti eivät vaatineet tutkimuksen aikana juurikaan optimointia. Sekä positiivista että negatiivista ionisointia käyttämällä saataisiin määritettyä useampia fenolisia yhdisteitä kuin vain toista tapaa käyttämällä, mutta käytännön kannalta se on kuitenkin hitaampaa ja työläämpää. Tässä tutkimuksessa päädyttiin käyttämään negatiivista ionisointia, sillä negatiivisella ionisoinnilla havaittiin enemmän yhdisteitä.

Fenoliset yhdisteet ovat luonteeltaan happamia karboksyyli- tai OH-ryhmien ansiosta, minkä johdosta ne deprotonoituvat helposti (Kammerer ym. 2012). Ionisoinnin vaikutuksesta yhdisteet pilkkoutuvat. Negatiivisia ioneja on tutkittu huomattavasti vähemmän kuin positiivisia ioneja, joten niiden pilkkoutumistavoista ei ole yhtä paljon tietoa (Ketola ym. 2010). Uusilla ionisaatiomenetelmillä pystytään kuitenkin tuottamaan helposti negatiivisia ioneja, joten niiden pilkkoutumisen selvittäminen on tullut yhä tärkeämmäksi. Negatiiviset ionit ovat yleensä pysyvämpiä kuin positiiviset ionit, joten niiden pilkkomiseksi tarvitaan törmäyksen aiheuttamaa pilkkoutumista (engl. collision induced dissociation). Parillisen negatiivisen elektronijärjestelmän ionit ovat useimmiten deprotonoituneita ioneja $[M-H]^-$. Myös antosyaanien havaittiin ionisoituvan negatiivisessa muodossa $[M-2H]^-$ (Jianghao ym. 2012). Antosyaaneilla on rakenteessaan positiivinen

varaus, minkä johdosta antosyaanit ionisoidaan yleensä positiivisella ionisoinnilla (Buendía ym. 2010; Kammerer ym. 2012; Alvarez-Fernandez ym. 2014). Antosyaanien $[M-2H]^+$ ionisoitumisesta ei ole paljon tutkimustietoa, joten tämä tutkimus toi uutta tietoa myös tähän aihepiiriin.

3.5.2.3 Menetelmien toistettavuuden arviointi

SPME-GC-MS-menetelmä

Kolmen rinnakkaisen näytteen suhteellinen keskihajonta SPME-GC-MS-menetelmän toistokokeissa oli lähes kaikilla näytteillä yli asetetun tason ($RSD \% \leq 20 \%$) ja yhteensä 51 %. PCA-kuvaajan perusteella menetelmän päivän sisäinen toistettavuus oli kuitenkin riittävä, sillä kunkin päivän toistokoesarjat erottuivat omina ryhminään (kuva 19).

Toistokoesarjojen välisiin eroihin voi olla monia syitä. Tässä menetelmässä hillonäytteitä ei erikseen homogenoitu ennen SPME-ampulliin punnitusta, koska hillon mansikan palaset eivät olleet menetelmän kannalta oleellisia. Päinvastoin hillon muu massa sisältäisi todennäköisemmin väärentävää ainetta kuin nämä palaset, joten homogenointia ei katsottu tarpeelliseksi. Osaan rinnakkaisista oli saattanut tulla myös näitä mansikan palasia, joten näytehillon homogenointi ennen punnitusta voisi parantaa toistettavuutta.

Erillisten näytteiden toistettavuuteen saattoi vaikuttaa myös se, että osa hilloista oli materiaaaliltaan paksumpaa. Tällöin jouduttiin käyttämään isompaa magneettia, mistä johtuen kuitu oli kauempana nestepinnasta kuin muissa uutoissa. Tämän mahdollista vaihtelua aiheuttavan tekijän voisi ratkaista siten, että kaikkiin näytteeseen lisättäisiin 1-2 ml vettä vastaavasti kuten Reidin ym. 2004 tutkimuksessa. Tällöin oltaisiin myös lähempänä Supelcon suosittamaa ilmatilan ja nesteen tilavuuden suhdetta 1/3 (kaasu/neste). Kvantitatiivista menetelmää varten tämä voisi olla hyvä lisäys menetelmään toistettavuuden parantamiseksi.

Neljän kuukauden aikana hilloissa on voinut tapahtua myös kemiallisia muutoksia säilöntäaineista huolimatta, vaikka hillojen hyllyikä on yleensä vähintään puoli vuotta. Pilaantuminen voi aiheuttaa virhearomeja, toisten yhdisteiden pitoisuus voi luonnostaan suurentua pitkän säilytyksen aikana ja toisten pienentyä jääkaappisäilytyksestä huolimatta. Virhearomeja mansikan flavoriin aiheuttavia etyyliasetaattia, asetaldehydiä ja etanolia (Hakala ym. 2002; Berna ym. 2007) ei kuitenkaan havaittu tutkimuksen mansikkahilloista. Etenkin etyyliasetaatti on yksi tärkeimmistä mansikan virhearomeista.

Myös sokerimuutokset ovat mahdollisia, sillä hillot sisälsivät noin puolet painostaan sokeria. Hillosokerin sakkaroosi on pelkistämätön sokeri, mutta varastoinnin aikana osa hillon sakkaroosista invertoituu pelkistäviksi sokereiksi (Ranganna 1991; Hansson ym. 2001; Lubbers ja Guichard 2003; Singh ym. 2009). Sakkaroosin invertoituminen voi vaikuttaa myös näytteiden aromikoostumukseen, sillä sokerit reagoivat hillon vesifaasin kanssa ja vaikuttavat siten aromiyhdisteiden vapautumiseen kaasufaasiin. Tutkimuksen aikana sokerien invertoitumista ei havaittu ottaa huomioon. Hillon sokerien invertoitumista olisi voinut testata esimerkiksi mittaamalla hillon sokereiden optinen kääntökulma määritysten yhteydessä, ja laskea eri vaiheissa tutkimusta paljonko sokerista on invertoitunutta.

Tutkimuksen GC -laitteistolla ei ollut käytössä laitteen toiminnan vertailunäytettä, koska kyseisellä laitteella jokaisessa käytössä olevassa menetelmässä on oma laadunvarmistus, esimerkiksi sisäinen standardiyhdiste (ISTD). On siten mahdollista, että myös laitteen toiminnassa on voinut tapahtua pieniä muutoksia. Määritysten aikana (helmikuu - kesäkuu) tehdyt muut analyysit ovat voineet vaikuttaa tuloksiin ja siten toistettavuuteen, esimerkiksi jos kolonniin on jäänyt jäämiä edeltäneistä ajoista.

Myös SPME-kuitu todettiin melko alttiiksi laboratorioilmasta tai itse kuidusta aiheutuville häiriöyhdisteille. Automaattisen näytteenottoajan käyttö manuaalisen injektoinnin sijaan vähentäisi näitä häiriöitä tehokkaasti. ISTD:n lisäys menetelmään voisi myös parantaa SPME-GC-MS-menetelmän toistettavuutta, vaikka ISTD:n valinta SPME-menetelmään voi olla haasteellista yhdisteiden erilaisten uuttumisominaisuuksien vuoksi. Toistettavuuden seuranta olisi kuitenkin selkeämpää ISTD:n avulla ja mahdollistaisi siirtymisen myös kvantitatiiviseen menetelmään. Myös SPME-GC-MS-menetelmällä voisi tällöin tehdä saantokokeita.

UHPLC-MS-menetelmä

Toistokokeille asetettu suhteellisen keskihajonnan taso oli $RSD \% < 20 \%$, joten UHPLC-MS-menetelmän toistettavuus oli vaatimusten mukainen. UHPLC-MS-menetelmän yhteenlaskettu RSD oli vain 10 %, mitä voidaan pitää hyvänä tuloksena.

Yksi selitys UHPLC-MS-menetelmän hyvään toistettavuuteen voi olla näytteiden esikäsittelyssä. Ennen ultraääniliuuttoa näyte homogenoitiin vielä erikseen liuottimen kanssa, jolloin rinnakkaisiin määrittäksiin ei tullut merkittäviä eroja. Menetelmä on myös melko vähän altis häiriöille ja laitteiston herkkyys on hyvä. UHPLC-MS-menetelmässä oli

myös melko vähän määritettäviä yhdisteitä. Kvantitoinnin kehittämiseksi ISTD:n voisi lisätä myös UHPLC-MS-menetelmään. Menetelmän saantokokeet tulisi uusaa, sillä saantoprosentti oli lähes 200 %. Saantokokeiden epäonnistuminen johtuu todennäköisesti tunnistamattomasta systemaattisesta virheestä, sillä tulokset olivat kuitenkin tasaisia rinnakkaisten saantokoenäytteiden välillä. Virhelähdettä ja syytä suureen saantoprosenttiin ei näissä kokeissa onnistuttu selvittämään.

3.5.3 Havaitut aromi- ja fenoliyhdisteet

Itse tehdyillä mansikka-, omena-, päärynä ja kurpitsahilloilla oli oletuksen mukaisesti kullekin kasville tyypillisiä aromiyhdisteitä. Aromiyhdisteiden tunnistukset olivat tässä tutkimuksessa kuitenkin vain alustavia ja perustuivat NIST- ja Wiley-spektritietokantoihin sekä kirjallisuuteen (mm. liitteet 1, 3, 5, 6). Myös havaitut fenoliset yhdisteet olivat kirjallisuuden perusteella pääasiassa tyypillisiä kullekin raaka-aineena olleelle kasville (mm. liitteet 2, 4, 5, 7). Fenolisten yhdisteiden tunnistukset olivat myös alustavia. Tunnistamisessa olisi massaspektrometrin lisäksi voitu hyödyntää UHPLC:n nelikanavaista UV-ilmaisinta (esim. fenolihapot (280 nm), flavonolit (360 nm) ja antosyaanit (520 nm ja 320 nm)). UV-ilmaisinta ei kuitenkaan hyödynnetty tässä tutkimuksessa tunnistamiseen, mutta menetelmän jatkokehityksessä UV-ilmaisinta voisi käyttää yhdisteiden kvantitoinnissa. Apuna fenolisten yhdisteiden määrittämisessä ja tunnistuksessa voisi käyttää myös muita fenolisten yhdisteiden, kuten antosyaanien, malliaineita. Malliaineiden avulla voisi varmentaa antosyaanien $[M-2H]^-$ ionisoitumista ja pilkkoutumista negatiivisella ionisoinnilla.

Floritsiini havaittiin odotuksen mukaisesti itse tehdystä omenahillosta. Floritsiinin molekyyli-ionin pilkkoutuminen vastasi myös kirjallisuudessa esitettyjä tietoja (Hilt ym. 2003; Kahle ym. 2005). Pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteenä pidetty floritsiini havaittiin omenahillon lisäksi myös kaikista mansikkahillonäytteistä. Ioniloukulla tehdyissä määrittämisissä floritsiinia ei välttämättä pystytty pilkkomaan liian heikon intensiteetin takia. Havainto varmistettiin kuitenkin lisäkokeiden avulla (kappale 3.4.2.1). Lisäkokeissa floritsiinin poikkeava kromatografinen erottuminen ja eluoituminen kaksoishuippuisena piikinä selittynee sillä, että käytettyyn kolonniin on saattanut jäädä jotain yhdistettä, mikä häiritsi määrittäystä (liite 14). Myös floretiiniksyloglukosidi havaittiin omenahillosta ja kaikista mansikkahillonäytteistä.

Floritsiinin havaitsemisesta mansikasta on vain vähän tutkittua tietoa, mutta myös Hiltin ym. (2003) tutkimuksissa mansikan fenolisten yhdisteiden joukosta havaittiin pieni määrä

floritsiinia. Hiltin tutkimuksissa havainto varmennettiin HPLC-MS- ja ydinmagneettinen resonanssi -menetelmillä. Floritsiiniä oli sitä ennen pidetty vain omenalle tyypillisenä yhdisteenä, ja sitä on edelleen käytetty omenalle tyypillisenä merkkiaineena elintarvikkeiden väärennösepäilyissä. Hiltin tutkimuksessa käytetyt mansikkalajikkeet olivat Honeoye, Elsanta ja Senga Sengana. Tässä tutkimuksessa tehty havainto vahvistaa floritsiinin havaitsemisen myös mansikan Polka-lajikkeesta. Tämä on tiettävästi ensimmäinen kerta, kun mansikan Polka-lajikkeesta löydettiin myös floretiiniksyloglukosidia.

Dihydrokalkoniyhdisteitä voidaan mahdollisesti edelleen pitää pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteinä, sillä floritsiinin pitoisuus oli Ida Red -lajikkeesta tehdyssä omenahillossa noin kymmenkertainen ja floretiiniksyloglukosidin pitoisuus noin kaksinkertainen verrattuna Polka-lajikkeesta tehtyyn mansikkahilloon. Hiltin ym. (2003) tutkimuksessa mansikasta löydettiin 2–5 mg/100 g (kuivapaino) floritsiinia. Tässä tutkimuksessa päärynähillosta ja kurpitsahillosta ei havaittu floritsiinia. Kurpitsasta ei havaittu myöskään floretiiniksyloglukosidia. Päärynästä tämä yhdiste havaittiin pienessä määrin.

Päärynöiden merkkiihdisteenä pidettyä arbutiinia ei tässä tutkimuksessa pystytty havaitsemaan päärynähillonäytteistä, vaikka Conference-lajikeen päärynöiden on todettu sisältävän arbutiinia (Escarpa ja Gonzales 2000). Arbutiini on pienikokoinen yhdiste, joka retentoitui heti gradientin alussa ja joka havaittiin massaspektrometrillä vain muurahaishappo-adduktina $[M+HCOOH-H]^-$. Todennäköinen syy arbutiinin havaitsemisongelmiin on se, että samaan aikaan näytteistä eluoitui esimerkiksi liuotinta ja sokereita, jolloin arbutiinia ei havaittu. Jatkotutkimuksissa arbutiinin määrittystä voisi kokeilla esimerkiksi hydrofiiliseen vuorovaikutusnestekromatografiaan (HILIC) soveltuvalla kolonnilla. HILIC:n liikkumaton faasi on poolinen ja liikkuvan faasin vesipohjainen osa toimii vahvana liuottimena, mikä on perinteiseen RPLC:hen nähden päinvastaista. Hydrofiilisten yhdisteiden pidättäminen onnistuu HILIC:ssa paremmin kuin RPLC:ssa, jossa kyseisten yhdisteiden pidättäminen on hankalaa.

3.5.4 Aromikoostumuksen PCA-tulokset

Mansikkahillo ja -sose

Useimmat Polka-mansikkalajikkeesta tehdyn tuoresoseen aromiyhdisteet havaittiin itse tehdystä mansikkahillosta, vaikka aromin intensiteetti olisi ollut vain 20 % alkuperäisestä

tuoresoseen aromin intensiteetistä. Siten voidaan olettaa, että jos väärennöshilloa keitetäisiin aromiyhdisteiden haihtumisen edistämiseksi pidempään kuin normaalisti, tietyt pysyvämmät yhdisteet olisi silti mahdollista havaita. Mansikkahillon ja tuoresoseen aromikoostumukset olivat kvantitatiivisuuden lisäksi erilaisia myös kvalitatiivisesti. Tutkimuksen kannalta oli siten perusteltua tutkia hilloja eikä vain tuoresoseita. Tuoreraaka-aineiden aromiyhdisteiden koostumusta ei voisi sellaisenaan verrata hillojen aromikoostumukseen. Hilloksi keittäminen vaikutti selvästi mansikan aromiyhdisteisiin, mikä on todettu aikaisemmissakin tutkimuksissa (Lesschaeve ym. 1991; Deuel ja Plotto 2004). Suuri määrä mansikan haihtuvia aromiyhdisteitä menetetään, kun tuoreesta mansikasta valmistetaan hilloa avoimessa ilmatilassa. Vakuumikattilassa valmistettaessa hillon aromikoostumus puolestaan vastaisi enemmän tuoreen mansikan aromikoostumusta, sillä haihtuvat yhdisteet kondensoituvat ja säilyvät tuotteessa.

Mansikan aromiyhdisteiden koostumus voi muuttua luonnostaan myös sadonkorjuun jälkeen. Esimerkiksi metyylibutanoaatin ja metyyliheksanoaatin pitoisuudet pienenevät tuoreessa mansikassa sadonkorjuun jälkeen, kun taas furaneolin, mesifuraanin ja nerolidolin määrät voivat kasvaa varastoinnin aikana (Williams ym. 2005; Berna ym. 2007). Pitkä varastointiaika vaikuttaa tuoreen mansikan aromiyhdisteiden säilyvyyteen enemmän kuin vaihtelevat säilytysolosuhteet (pakastus, jääkaappi, huoneenlämpö ym.) (Deuel ja Plotto 2004; Berna ym. 2007).

Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo ja kurpitsahillo

Aromikoostumuksen on todettu olevan kullekin kasvilajille tyypillinen. Myös tässä työssä itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat toisistaan selkeinä ryhminä aromiyhdisteiden koostumuksen perusteella tutkituilla lajikkeilla (Polka, Ida Red, Conference ja Batternut). Hillojen väliset erot aromikoostumuksessa selittivät 63 % näytteiden välisestä kokonaisvaihtelusta kahden ensimmäisen pääkomponentin mukaan. Omenahillon ja kurpitsahillon aromiyhdisteiden koostumukset erosivat toisistaan eniten, ja seuraavaksi eniten muiden hillojen aromikoostumuksesta poikkesi mansikkahillo.

Mansikkahillo ja omenahillo

Ida Red -lajikkeesta tehty omenahillo erottui aromikoostumuksensa perusteella selvästi Polka-lajikkeesta tehdystä mansikkahillosta. Työssä käytetyllä SPME-GC-MS-menetelmällä väärennös, eli omenahillon lisäys mansikkahilloon, pystyttiin havaitsemaan jo 5 %:n lisäystasolla, vaikka omenahillolisäyksen määrää ei onnistuttaisi nykyisellä menetelmällä määrittämään tarkasti. Ero mansikka-omenahilloseosten ja puhtaan

mansikkahillon välillä oli selkeä myös silloin, kun omenahillo poistettiin analyysistä. Kiinnostavin havainto mansikkahillon ja omenahillon aromikoostumusten eroissa oli omenalle tyypillisen α -farneseenin erottuminen mansikan ja omenan hilloseoksista. α -farneseenia voisi käyttää myöhemmissä tutkimuksissa omenahillon merkkiyhdisteenä.

Reidin ym. (2004) työryhmä teki vastaavanlaisia havaintoja tutkimuksessaan. Kyseisessä tutkimuksessa väärentämiseen käytettiin omenasosetta, jota lisättiin erilaisina pitoisuuksina mansikkasoseisiin. Tutkimuksessa SPME-GC-MS-tekniikka todettiin mahdollisesti hyödylliseksi menetelmäksi väärentävän raaka-aineen havaitsemisessa merkkiyhdisteiden avulla. Havaitsemisrajaksi Reidin tutkimuksessa oli saatu 25 % (v/v) omenaa mansikkasoseen joukossa. Lisäksi menetelmää voitiin hyödyntää kyseisen väärentävän raaka-aineen tunnistamisessa merkkiyhdisteiden avulla. Omenalle tyypillisiä yhdisteitä kirjallisuuden perusteella ovat mm. heksaanihappo, 2-heksenaali sekä α -farneseeni, joista 2-heksenaali ja α -farneseeni havaittiin myös tässä tutkimuksessa. Heksaanihappoa havaittiin tässä työssä sen sijaan mansikkahillosta. Merkittävimpänä erona Reid ym. (2004) tutkimukseen verrattuna tässä työssä käytettiin hilloja tuoresoseiden sijaan. Omenalisäys havaittiin hilloseoksesta myös alhaisempana määränä kuin Reid ym. (2004) tutkimuksessa soseista.

Mansikkahillo ja päärynähillo sekä mansikkahillo ja kurpitsahillo

Päärynähillo (lajike Conference) ja kurpitsahillo (lajike Butternut) sekä niistä tehdyt väärennöshillot erottuivat aromikoostumuksen perusteella vastaavalla tavalla Polka-lajikkeesta tehdystä mansikkahillosta kuin omenahillo. Ero oli havaittavissa jo 5 %:n lisäystasolla. Vastaavia tutkimuksia ei tiettävästi ole tehty, joten tulokset ovat tältä osin uutta tietoa. Päärynähilloa ja kurpitsahilloa sisältäneet seokset erosivat puhtaasta mansikkahillosta myös silloin kun vertailuhillona toiminut päärynä- tai kurpitsahillo poistettiin PCA:sta. 50 % päärynää tai kurpitsaa sisältäneiden mansikkahillojen aromikoostumukset erosivat selvästi puhtaan mansikkahillon aromikoostumuksesta. 50-prosenttinen lisäys erottui selvemmin myös muista lisäystasoista. 5–20 % päärynää tai kurpitsaa sisältäneiden väärennösseosten rinnakkaiset näytemääritykset ryhmittyivät PCA-kuvaajassa lomittain, mikä kertoo siitä, että aromikoostumusten erot seosten välillä eivät olleet tasaisia tai suuria. Lisäyksen kvantitatiivista määrää ei siten onnistuttaisi määrittämään myöskään päärynähillosta tai kurpitsahillosta tehdyistä mansikkahilloseoksista.

Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo, kurpitsahillo ja kaupalliset näytteet

Kahden ensimmäisen pääkomponentin selitysaste näyttöjen välisestä kokonaisvaihtelusta oli yhteensä vain 24–26 % riippumatta siitä, käytettiinkö kaupallisten näyttöjen vertailussa lisäksi omena-, päärynä- ja kurpitsahilloja vai pelkästään mansikkahilloa. Vaikka selitysaste kokonaisvaihtelusta oli pieni, voitiin hillonäyttöjen ryhmittäminen PCA-kuvaajassa havaita kuitenkin selvästi. Pieni selitysaste saattaa johtua myös taustalla olevasta suuresta määrästä aineistoa (noin 170 aromiyhdistettä 63 rinnakkaisnäytteenä). Ääriarvoja seulovan Hotelling T^2 -ympyrän ulkopuolelle jääneet näytteet (kaikki näyte M:n rinnakkaiset, kaksi näyte F:n rinnakkaista sekä yksi rinnakkainen päärynähillosta) saattoivat olla joko ääriarvoja tai erottua näytejoukosta muista syistä. Muut syyt saattoivat lähinnä olla merkitsevästi muusta näytejoukosta poikkeava aromiyhdisteiden koostumus. Päärynähillon poikkeavuus muista näytteistä voi selittyä jo sillä, että se oli eri raaka-aineesta tehty. Vertailun perusteella ei ollut syytä olettaa, että kaupalliset näytteet sisältäisivät ainakaan Ida Red -lajikkeen omenaa, Butternut-lajikkeen kurpitsaa tai Conference-lajikkeen päärynää. Lähemmin tarkasteltiin siten vain kaupallisia näytteitä.

Syitä hillonäyte M:n ja F:n poikkeavuuteen voi olla useita. Kahden poikkeavan kaupallisen näytteen tyypilliset aromiyhdisteet olivat pääasiassa eri yhdisteitä kuin itse tehtyjen hillojen aromiyhdisteet (kuvat 44 ja 45). Näyte F sisälsi pakkausselosteen mukaan lisättyä aromiainetta, mikä voi jo yksistään selittää kyseisen näytteen poikkeavuuden. Alustavan tunnistuksen perusteella näyte F:stä tunnistettiin yhdiste, isoamyyli-isovaleraatti (3-metyylibutyli-3-metylibutanoaatti), joka on kirjallisuuden perusteella tyypillinen aromiaine omenalle (Maarse 1977). Yhdistettä ei ole kirjallisuuden perusteella havaittu mansikasta, joten kyseinen yhdiste on mahdollisesti siis näytteeseen lisätty aromiaine. Näytteestä alustavasti tunnistetut muut aromiyhdisteet (mm. 2-metyylibutaanihappo, Z-cis-3-heksenyliasettaatti, heksenyliasettaatti, metyyliisovaleraatti, dekanaali, E-2-oktanaali sekä metyylikinnamaatti) olivat mansikalle tyypillisiä yhdisteitä (Maarse 1977).

Näyte M:stä havaitu naftaleeni-yhdiste oli rakenteeltaan hyvin samantyyppinen α -ionenin kanssa, mutta tunnistamisesta ei voitu olla varmoja. α -ionenin havaitseminen mansikkahillosta voisi kuitenkin olla poikkeuksellista, sillä α -ioneni on muun muassa vadelmalle tyypillinen aromiyhdiste, mutta ei mansikalle. Kyseisen näytteen kohdalla voisi siten olla kyse myös väärennöksestä (esimerkiksi, jos hilloon olisi lisätty pakkausselosteessa mainitsematonta aromiainetta tai muuta raaka-ainetta), vaikka näiden tulosten perusteella ei sellaista voida suoranaisesti epäillä. Erot näyte M:n ja muiden

hillojen välillä olivat kuitenkin pieniä, koska kokonaisselitysaste näytteiden välisestä vaihtelusta oli vain 24 %.

Kaupallisten näytteiden raaka-aineiden lajikkeet eivät myöskään olleet tiedossa, joten hilloissa on todennäköisesti käytetty joitain muitakin lajikkeita kuin itse tehdyssä hillossa käytettyä Polkaa. Hilloteollisuudessa yleisesti käytetty mansikkalajike on muun muassa Senga Sengana (EU raportti 2006). On siten mahdollista, että näyte M:ssä olisi käytetty sellaista mansikkalajiketta tai lajikkeiden sekoituista, mitä ei ole käytetty muissa tämän tutkimuksen näytteissä. Mansikan aromiyhdisteiden monimuotoisuutta lisää se, että haihtuvien aromiyhdisteiden profiili vaihtelee mansikkalajikkeiden välillä eli lajikkeen genotyyppi vaikuttaa koostumukseen (Hakala ym. 2002). Myös saman lajikkeen koostumus voi vaihdella kypsyksen kauden, vuodenajan ja kasvuvuoden mukaan sekä kasvuympäristön ja -ilmaston vaihteluiden vaikutuksesta (Hakala ym. 2002; Williams ym. 2005). On kuitenkin yllättävää, että näytteiden välillä ei ollut enempää vaihtelua, sillä on todennäköistä, että kaupallisissa hilloissa on käytetty eri vuodenaikaan kasvatettuja eri lajikkeita, tai vähintäänkin eri maista ja erilaisista kasvuolosuhteista lähtöisin olleita lajikkeita. Tietävästi raaka-aineita oli peräisin Suomen lisäksi Puolasta ja Kiinasta.

3.5.5 Fenolikoostumuksen PCA-tulokset

Mansikkahillo ja mansikkasose

Polka-mansikkalajikkeesta tehty mansikkahillo ja tuoresose erosivat fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella toisistaan. Hilloksi keittäminen vaikutti odotetun selvästi mansikan fenolisiin yhdisteisiin, ja fenoliset yhdisteet olivat intensiteetiltään keskimäärin puolet pienempiä mansikkahillossa kuin mansikkasoseessa. Prosessointitavasta riippuen mansikkahillon kokonaisfenolipitoisuuden onkin todettu olevan keskimäärin noin 15 % pienempi kuin tuoreen mansikan (Klopotek ym. 2005; Aaby ym. 2007b). Fenolisista yhdisteistä voi myös muodostua prosessoinnissa hajoamistuotteita sekä uusia kompleksisia yhdisteitä. Etenkin vapaan ellagihapon pitoisuuden on todettu olevan suurempi hilloissa kuin mansikkasoseissa johtuen ellagitanniinien hajoamisesta (Kähkönen ym. 2001; Deuel ja Plotto 2004; Da Silva Pinto ym. 2007; Koponen ym. 2007). Myös tässä tutkimuksessa ellagihapon intensiteetti kasvoi prosessoinnissa ja oli keskimäärin jopa 70 % suurempi hillossa kuin soseessa.

Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo ja kurpitsahillo

Itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat toisistaan selkeinä ryhminä fenolisten yhdisteiden koostumuksen perusteella. Mansikkahillon fenolikoostumus erosi muista hilloista eniten, mikä selitti 59 % vaihtelusta. Seuraavaksi suurin ero oli omenahillon ja kurpitsahillon fenolisten yhdisteiden välillä. Päärynän ja kurpitsan lähekkäisyys PCA-kuvaajassa voi kertoa siitä, että raaka-aineet sisälsivät alun perin vähemmän fenolisia yhdisteitä kuin mansikka ja omena. On myös mahdollista, että näiden raaka-aineiden yhdisteet hajosivat hilloksi keittämisessä enemmän verrattuna omena- ja mansikkaan (päärynähillon yhdisteiden intensiteetit olivat kaikkien verrattain pieniä). Yksi vaihtoehto on myös se, että määritysolosuhteista johtuen kaikkia yhdisteitä ei saatu määritettyä. Tällaisia yhdisteitä ovat voineet olla esimerkiksi lajikkeille tyypilliset arbutiini ja syreeninihappo, mistä johtuen tulokset voivat olla vääristyneitä.

Mansikkahillo ja omenahillo, mansikkahillo ja päärynähillo sekä mansikkahillo ja kurpitsahillo

Mansikkahilloväärennökset, jotka sisälsivät lisättyä omena-, päärynä- tai kurpitsahilloa joko 5 %, 10 %, 20 % tai 50 %, erottuivat fenolikoostumuksen perusteella itse tehtyjen mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillojen fenolikoostumuksista. Erot mansikkahillon ja väärennösesten välillä olivat selkeät myös silloin, kun omena-, päärynä- tai kurpitsahillo poistettiin kustakin pääkomponenttianalyysistä.

Poiketen muista hilloseostuloksista mansikkahillon 50 % omenahilloa sisältänyt seos oli PCA-kuvaajan perusteella fenoliselta koostumukseltaan lähempänä mansikkahilloa, kuin 5–20 % omenahilloa sisältäneet mansikkahillot. Mansikka-omenaseosten määritykset tehtiin vasta laitteiston huollon jälkeen, samoin kuin verrokkina käytetyn itse tehdyn mansikkahillon määritys, joten kertoimella korjaamisen ei pitäisi vaikuttaa näihin tuloksiin. Intensiteettivaihtelut eivät silti olleet merkittäviä kvalitatiivisen menetelmän kannalta, vaikka poikkeaville tuloksille ei löydetty selitystä. 5–20 % päärynähilloa tai kurpitsahilloa sisältäneiden hilloseosten fenolikoostumus oli PCA-kuvaajan perusteella puolestaan lähempänä mansikkahillon fenolikoostumusta kuin 50 % päärynähilloa tai kurpitsahilloa sisältäneiden seosten koostumus, kuten voi olettaa.

Vaikka hillolisäys erottui puhtaasta mansikkahillosta jo 5 %:n lisäystasolla, nykyisellä menetelmällä olisi haasteellista määrittää seosten kvantitatiivisia eroja. 5–20 % lisäystä sisältäneiden mansikkahillojen väliset fenolikoostumuksen erot eivät PCA-kuvaajan

perustella olleet niin suuria, että seokset olisivat erottuneet keskenään. 5–20 % päärynähilloa sisältäneet mansikkahillot erottuivat toisistaan kuitenkin selkeämmin kuin 5–20 % omenahilloa sisältäneet mansikkahillot. Mansikkahillot, jotka sisälsivät 50 % muuta raaka-ainetta, erottuivat selvästi muista lisäystasyksistä.

Mansikkahillo, omenahillo, päärynähillo, kurpitsahillo ja kaupalliset näytteet

Omena-, päärynä- ja kurpitsahillo erottuivat eniten muista näytteistä verrattaessa kaupallisia näytteitä itse tehtyihin mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahilloihin fenolikoostumuksen perusteella. Vertailun perusteella ei ollut syytä olettaa, että kaupalliset näytteet sisältäisivät ainakaan Ida Red -lajikkeen omenaa, sillä omena sijoittui kauas muista näytteistä PCA-kuvaajassa. Kaupallisia hilloja verrattiin pelkästään myös mansikkahilloon. Osa kaupallisista näytteistä saattoi sisältää samaa lajiketta kuin itse tehty mansikkahillo, sillä näiden näytteiden fenolinen koostumus oli hyvin samankaltainen (näytteet ryhmittäytyivät lähekkäin PCA-kuvaajassa). Osassa kaupan näytteistä puolestaan on hyvin todennäköisesti käytetty eri lajiketta kuin Polka. Mansikkasoseen eroavaisuus mansikkahilloihin verrattuna havaittiin myös kaupallisten näytteiden kohdalla, sillä näyte G erottui muista näytteistä.

Kaksi kaupallista mansikkahillonäytettä (C ja H) erottui myös muusta ryhmästä. Poikkeaville hillonäytteille tyypillisistä yhdisteistä esimerkiksi p-kumaryyliheksaani intensiteetit olivat näissä kahdessa näytteessä suurempia kuin muissa kaupallisissa näytteissä tai itse tehdyssä mansikkahillossa, mikä saattoi aiheuttaa poikkeavuuden. Syynä pitoisuuseroon voi olla esimerkiksi eri lajike tai prosessointitapa. Koska p-kumaryyliheksaani on kuitenkin mansikalle tyypillinen yhdiste, ei ollut syytä epäillä väärennöstä.

Lisäksi fenolisten yhdisteiden erojen arvioinnissa on otettava huomioon vain kaupallisille näytteille tyypillisten fenolisten yhdisteiden puuttuminen tuloksista. Näissä PCA-vertailuissa voitiin siten verrata ainoastaan kaupallisten näytteiden fenolikoostumuksen samanlaisuutta Polka-lajikkeesta tehdyn mansikkahillon koostumukseen nähden.

4 PÄÄTELMÄT

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää miten tutkimukseen valitut tekniikat SPME-GC-MS ja UHPLC-MS soveltuivat väärennosten tunnistamiseen hillojen aromi- ja

fenolikoostumuksia määrittämällä, sekä kehittää alustava kvalitatiivinen määrittämenetelmä Tullilaboratorion valvontakäyttöön hilloväärennösten havaitsemiseen. Molemmilla menetelmillä mansikkahilloväärennöksen havaitseminen todettiin mahdolliseksi. Itse tehdyt väärennös-mansikkahillot erottuivat puhtaasta mansikkahillosta jo silloin, kun väärennös sisälsi 5 % lisättyä omenahilloa, päärynähilloa tai kurpitsahilloa. Väärennös erottui puhtaasta mansikkahillosta sekä aromikoostumuksen että fenolikoostumuksen perusteella tutkimukseen valituilla lajikkeilla (mansikka: Polka, omena: Ida Red, päärynä: Conference ja kurpitsa: Butternut). Väärennökset, jotka sisälsivät 50 % lisättyä raaka-ainetta, erottuivat hyvin selkeästi. Nykyisellä menetelmällä lisäyksen kvantitatiivista määrää olisi kuitenkin haasteellista määrittää, sillä näytteiden välisiä eroja oli huomattavasti hankalampi havaita mansikkahilloissa, joita oli jatkettu 5–20 % toisella raaka-aineella.

PCA osoittautui hyödylliseksi työkaluksi väärennöksen havaitsemisessa, mutta väärennös oli mahdollista havaita myös kromatogrammeja tarkastelemalla ja yksittäisten yhdisteiden, kuten omenan α -farneseenin, avulla. PCA kuitenkin helpotti ja nopeutti tulosten tulkintaa visualisoimalla tulokset helposti tulkittavaksi graafiseksi esitykseksi.

Homogenointi ja hilloksi keittäminen vaikuttivat selvästi mansikkahillon aromi- ja fenolikoostumukseen. Tuoreraaka-aineiden koostumusta ei siten voi verrata hillojen koostumukseen, joten jatkossakin on oleellista tutkia nimenomaan hillojen aromi- ja fenolikoostumuksia. Myös lajikevaihtelusta sekä varastoinnin aiheuttamista muutoksista tarvitaan lisää tutkimusta, sillä yhdisteiden kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen vaihtelu voivat vaikuttaa menetelmien toistettavuuteen. Mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan eri lajikkeiden välinen vaihtelu hillojen aromi- ja fenolikoostumuksessa olisi tämän tutkimuksen perusteella syytä tutkia, jotta väärennöksen havaitsemisesta voidaan varmistua. Itse tehdyt mansikka-, omena-, päärynä- ja kurpitsahillot erosivat kuitenkin toisistaan selkeinä ryhminä sekä aromi- että fenolikoostumuksen perusteella. Kiinnostavana löytönä Polka-mansikkalajikkeesta havaittiin tässä tutkimuksessa pääasiassa omenalle tyypillisenä yhdisteenä pidettyä floritsiinia sekä floretiiniksyloglukosidia.

Vaikka kaupallisten näytteiden vertaaminen itse tehtyihin hilloihin oli vain suuntaa antavaa, aromikoostumusten erojen perusteella yksi kaupallinen näyte oli kuitenkin mahdollisesti epäilyttävä. Fenolisten yhdisteiden perusteella ei ollut syytä epäillä väärennöstä. Vain kaupallisille näytteille tyypilliset fenoliset yhdisteet eivät kuitenkaan olleet mukana fenolikoostumusten PCA-vertailussa, mikä rajoitti tulosten tarkastelua siltä

osin. Tulosten tulkintaa hankaloitti myös laitteiston huollosta johtuneet signaalien intensiteettimuutokset. Kumpaankin tulosaineistoon vaikuttavien epävarmuustekijöiden johdosta kaupallisten näytteiden osalta ei voitu tehdä pitäviä johtopäätöksiä, ja menetelmien soveltaminen kaupallisten näytteiden aitouden arvioitiin voitiin siten todeta haasteelliseksi.

Kaupallisten näytteiden aitoutta voidaan testata jatkotutkimuksissa uudelleen, kun menetelmien toistettavuutta ja saantokokeiden tuloksia on onnistuttu parantamaan. Aromiyhdisteiden SPME-GC-MS-menetelmän toistettavuus oli huomattavasti huonompi kuin fenoliyhdisteiden UHPLC-MS-menetelmän toistettavuus. Yhdisteiden intensiteeteissä havaittiin myös luontaisia muutoksia säilytyksen aikana. Fenolimenetelmässä tehty saantokoe epäonnistui todennäköisesti systemaattisesta virheestä johtuen, joten myös saantokokeet tulisi uusida. Tutkimuksen jatkokehitysehdotuksena esitetään ISTD:n lisäystä molempiin menetelmiin. ISTD parantaisi toistettavuuden seuraamista sekä mahdollistaisi menetelmien kehityksen kvantitatiiviseksi. SPME-GC-MS-menetelmään olisi mahdollista lisätä myös automaattinen näytteenäyttävä, mikä parantaisi toistettavuutta. Menetelmissä voisi keskittyä myös vain muutama, väärennösatriisille tyypillisen ja mahdollisimman stabiilin yhdisteen kvantitointiin, esimerkiksi aromiyhdisteiden osalta omenan α -farneseenin kvantitoimiseen.

Menetelmiä voidaan kuitenkin käyttää hillonäytteiden alustavassa testaamisessa, kun toistettavuus on saatu paremmaksi. SPME-GC-MS oli kokonaismääritysaltaan nopeampi menetelmä kuin UHPLC-MS, mikä Tullilaboratorion rutiinivalvontakäytössä on suuri etu, joten määrityksen voisi ensin tehdä SPME-GC-MS-menetelmää käyttäen. Kahden menetelmän käyttö tuntemattomasta hillonäytteestä tuo luotettavamman kuvan hillon aitoudesta. Toisaalta väärennös voi olla laimennettu hillo eli sisältää liian vähän varsinaista pääraaka-ainetta. Epäilyttävän hillon voisi testata myös refraktometrisesti (kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen).

SPME-GC-MS- ja UHPLC-MS-menetelmiä voidaan myöhemmin laajentaa koskemaan myös muiden hedelmä- ja marjahillojen sekä mehujen ja muiden tuotteiden aitouden valvontaa. Menetelmillä voidaan mahdollisesti todeta myös sellainen tuote, johon on lisätty pakkausselosteessa mainitsematonta aromiainetta, tai toisin päin lisätty tuotepakkaukseen aromiyhdiste-merkintä peittämään muun väärentävän yhdisteen lisäystä. Tutkimuksen pohjalta voidaan tehdä myös muunlaista jatkotutkimusta elintarvikeväärennöksiin tai esimerkiksi mansikan, omenan, päärynän tai kurpitsan aromi- ja fenoliyhdisteisiin liittyen.

LÄHDELUETTELO

- [Euroopan komissio 2016] Luettu 4.1.2016. RASFF Portal. Product type: food. Hazard category: adulteration/fraud. Notified: 2013 / 2014 / 2015. <http://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>
- [Euroopan komissio 2015] Luettu 20.11.2015. Geographical indications and traditional specialties. http://ec.europa.eu/agriculture/quality/schemes/index_en.htm
- [Europol 2015] Luettu 2.10.2015. Europol press release 16.2.2015. <http://www.europol.europa.eu/content/record-seizures-fake-food-and-drink-interpol-europol-operation>
- [FAOSTAT 2015] Luettu 3.12.2015. Production: Crops. Regions: World. Elements: Production quantity. Items: Apples / Pears / Pumpkins, squash and gourds / strawberries. Year: 2013. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>
- [Fineli 2014a] Luettu 10.11.2014. Mansikka. <http://www.fineli.fi/food.php?foodid=447&lang=fi>
- [Fineli 2014b] Luettu 10.11.2014. Mansikkahillo, teollinen, sokeria 46 g/100g. <http://www.fineli.fi/food.php?foodid=33559&lang=fi>
- [Grocery Manufactures Association 2010] Luettu 21.12.2015. Consumer product fraud: Deterrence and Detection. <http://www.gmaonline.org/downloads/wygwam/consumerproductfraud.pdf>
- [Kotimaiset kasvikset ry. 2014] Luettu 10.11.2014. Mansikka. http://www.kasvikset.fi/suomeksi/asiakkaille/kasvitieto/kasvit_a-o/m/mansikka
- [Tulli 2015] Luettu 21.12.2015. Tullilaboratorio - valvonta-analytiikan asiantuntija. http://www.tulli.fi/fi/suomen_tulli/tullilaboratorio/index.jsp
- [Tullihallitus Tilastopalvelu 2015]. Luettu 21.12.2015. Ulkomaankauppatilastot: Mansikan tuonti ja vienti 2013. CN 20079933 (2002--.) Strawberry jams, jellies, marmalades, purées or pastes, obtained by cooking, with sugar content of > 30% (excl. homogenized preparations of subheading 2007.10) <http://uljas.tulli.fi/>
- [USP's Food Fraud Database 2015] Luettu 2.10.2015. <http://www.foodfraud.org/>
- Aaby K, Ekeberg D, Skrede G. 2007a. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. J Agric Food Chem. 55: 4395–4406.
- Aaby K, Wrolstad RE, Ekeberg D, Skrede G. 2007b. Polyphenol Composition and Antioxidant Activity in Strawberry Purees; Impact of Achene Level and Storage. J Agric Food Chem. 55: 5156–5166.
- Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G. 2012. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. Food Chem 132: 86–97.
- Alarcón-Flores MI, Romero-González R, Martínez Vidal JL, Garridon Frenich A. 2014. Luku 16: Fast and Reliable Analysis of Phenolic Compounds in Fruits and Vegetables by UHPLC-MS. Teoksessa: Naushad M, Rizwan Khan M, toim. Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Evaluation and Applications in Food Analysis. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s 411–446.
- Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. 2004. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. J Chrom A 1046: 89–100.

- Álvarez-Fernández MA, Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2014. Effects of the strawberry (*Fragaria ananassa*) purée elaboration process on non-anthocyanin phenolic composition and antioxidant activity. *Food Chem* 164: 103–112.
- Andrade PB, Carvalho ARF, Seabra RM, Ferreira MA. 1998. A Previous Study of Phenolic Profiles of Quince, Pear, and Apple Purees by HPLC Diode Array Detection for the Evaluation of Quince Puree Genuineness. *J Agric Food Chem* 46: 968–972.
- Apréa E, Gika H, Carlin S, Theodoridis G, Vrhovsek U, Mattivi F. 2011. Metabolite profiling on apple volatile content based on solid phase microextraction and gas-chromatography time of flight mass spectrometry. *J Chrom A* 1218: 4517–4524.
- Azodanlou R, Darbellay C, Luisier J-L, Villettaz J-C, Amadò R. 2003. Quality Assessment of Strawberries (*Fragaria* Species). *J Agric Food Chem* 51: 715–721.
- Bangerth F. 1984. Changes in sensitivity for ethylene during storage of apple and banana fruits under hypobaric conditions. *Sci Hort* 24: 151–163.
- Berna AZ, Geysen S, Li S, Verlinden BE, Lammertyn J, Nicolaï BM. 2007. Headspace fingerprint mass spectrometry to characterize strawberry aroma at super-atmospheric oxygen conditions. *Postharvest Biol Technol* 46: 230–236.
- Buendía B, Gil MI, Tudela JA, Gady AL, Medina JJ, Soria C, López JM, Tomás-Barberán FA. 2010. HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. *J Agric Food Chem* 58: 3916–3926.
- Bursać Kovačević D, Levaj B, Dragović-Uzelac V. 2009. Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content in Strawberry Fruit and Jam. *Agric Consp Sci* 74(3): 155–159.
- Cao X, Wang C, Pei H, Sun B. 2009. Separation and identification of polyphenols in apple pomace by high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chrom A* 1216: 4268–4274.
- Carbone F, Preuss A, De Vos RCH, D'Amigo E, Perrotta G, Bovy AG, Martens S, Rosati C. 2009. Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant Cell Envir* 32: 1117–1131.
- Chen J, Wang Z, Wu J, Wang Q, Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chem* 104: 268–275.
- Chervin C, Speirs J, Loveys B, Patterson BD. 2000. Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh. *Postharvest Biol Technol* 19: 279–285.
- Cooke D, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo T. 2005. Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur J Cancer* 41: 1931–1940.
- Da Silva Pinto M, Lajolo FM, Genovese MI. 2007. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Strawberry Jams. *Plant Foods Hum Nutr* 62: 127–131.
- De Boishebert V, Giraudel J-L, Montury M. 2006. Characterization of strawberry varieties by SPME–GC–MS and Kohonen self-organizing map. *Chemom Intel Lab Syst* 80: 13–23.
- De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2000 Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem* 48: 5331–5337.
- Deuel CL, Plotto A. 2004. Luku 22: Strawberries and Raspberries. Teoksessa: Barrett DM, Somogyi LP, Ramaswamy HS, toim. *Processing Fruits - Science and Technology*. 2. painos. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- Downey G, Kelly JD. 2004. Detection and Quantification of Apple Adulteration in Diluted and Sulfited Strawberry and Raspberry Purees Using Visible and Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 52: 204–209.
- Dragovic-Uzelac V, Delonga K, Levaj B, Djakovic S, Pospisil J. 2005. Phenolic Profiles of Raw Apricots, Pumpkins, and Their Purees in the Evaluation of Apricot Nectar and Jam Authenticity. *J Agric Food Chem* 53: 4836–4842.
- Ehala S, Vaheer M, Kaljurand M. 2005. Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity. *J Agric and Food Chem* 53: 6484–6490.
- Elss S, Preston C, Appel M, Heckel F, Schreier P. 2006. Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography–mass spectrometry and on-line gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. *Food Chem* 98: 269–276.
- Eriksson L, Byrne T, Johansson E, Trygg J, Vikström C. 2013. Multi- and Megavariate Data Analysis - Basic Principles and Applications. 3. painos. Malmö, Ruotsi: MKS Umetrics AB.
- Escarpa A, Gonzáles MC. 2000. Evaluation of High-Performance Liquid Chromatography for Determination of Phenolic Compounds in Pear Horticultural Cultivars. *Chromatographia* 51(1/2): 37–43.
- EU Neuvoston direktiivi 2001/113/EY. Annettu 20 päivänä joulukuuta 2001 elintarvikkeina käytettävistä hedelmähilloista, hyytelöistä ja marmeladeista sekä makeutetusta kastanjasoseesta.
- Euroopan komissio. 2006. Review of the sector of soft fruits and cherries intended for processing in the EU (SEC(2006) 838).
- Euroopan komissio. 2013. REPORT on the food crisis, fraud in the food chain and the control thereof (2013/2091(INI)) Committee on the Environment, Public Health and Food Safety. A7-0434/2013.
- Euroopan komissio. 2014. RASFF Food information exchange news: 14-751. Suspicion of adulteration of Strawberry jam from Greece.
- Fan X, Mattheis JP, Buchanan DA. 1998. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *J Agric Food Chem* 46: 1959–1963.
- Fügel R, Carle R, Schieber A. 2004. A novel approach to quality and authenticity control of fruit products using fractionation and characterization of cell wall polysaccharides. *Food Chem* 87: 141–150.
- Fügel R, Carle R, Schieber A. 2005. Review: Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams - a review. *Trends Food Sci Tech* 16: 433–441.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán A. 1997. Determination of Authenticity of Fruit Jams by HPLC Analysis of Anthocyanins. *J Sci Food Agric* 73: 207–213.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán A. 1998. The use of Acetone as an Extraction Solvent for Anthocyanins from Strawberry Fruit. *Phytochem analys* 9: 274–277.
- Gasperotti M, Masuero D, Guella G, Palmieri L, Martinatti P, Pojer E, Mattivi F, Vrhovsek U. 2013. Evolution of Ellagitannin Content and Profile during Fruit Ripening in *Fragaria* spp. *J Agric Food Chem* 61: 8597–8607.
- Grosch W. 2004. Luku 20: Aroma Compounds. Teoksessa: Nollat LML, toim. Handbook of Food Analysis. 3. painos. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s 717–746.

- Güldner A, Winterhalter P. 1991. Structures of two new ionone glycosides from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). *J Agric Food Chem* 39: 2142–2146.
- Hakala MA, Lapveteläinen AT, Kallio HP. 2002. Volatile Compounds of Selected Strawberry Varieties Analyzed by Purge-and-Trap Headspace GC-MS. *J Agric Food Chem* 50: 1133–1142.
- Hansson A, Andersson J, Leufvén A. 2001. The effect of sugars and pectin on flavour release from a soft drink-related model system. *Food Chem* 72: 363–368.
- Hartmann A, Patz C-L, Andlauer Q, Dietrich H, Ludwig M. 2008. Influence of Processing on Quality Parameters of Strawberries. *J Agric Food Chem* 56: 9484–9489.
- He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 1: 163–187.
- Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI. 1998. Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. *J Agric Food Chem* 46: 25–31.
- Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, Beifuss U, Carle R. 2003. Detection of Phloridzin in Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 51: 2896–2899.
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Heinonen IM, Törrönen AR. 2000a. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur Food Res Technol* 212: 75–80.
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Törrönen AR. 2000b. Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. *J Agric Food Chem* 48: 2960–2965.
- Häkkinen SH, Törrönen AR. 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res Int* 33: 517–524.
- Ibáñez E, López-Sebastián S, Ramos E, Tabera J, Reglero G. 1998. Analysis of volatile fruit components by HS-SPME. *Food Chem* 63: 281–286.
- Imeh U, Khokhar S. 2002. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. *J Agric Food Chem* 50: 6301–6306.
- Jaatinen J. 2016. Raffinoidun kasviöljyn tunnistaminen ekstra-neitsytoliiviöljystä UV-absorption ja stigmastadienipitoisuuden perusteella. Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos.
- Josuttis M, Verral S, Stewart D, Krüger E, McDougall GJ. 2013. Genetic and Environmental Effects on Tannin Composition in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Cultivars Grown in Different European Locations. *J Agric Food Chem* 61: 790–800.
- Kahle K, Kraus M, Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res* 49: 797–806.
- Kammerer DR, Kramer M ja Carle R. 2012. Luku 21: Phenolic compounds. Teoksessa: Nollet, ML, Toldra F, toim. *Food Analysis by HPLC*. 3. painos. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group. s. 717–756.
- Ketola, R, Kostiaainen, R, Kotiaho T ja Vainiotalo, P. 2010. Massaspektrometrian perusteet. 1. painos. Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Hakapaino, Helsinki. 273 s.
- Kebede BT, Grauwet T, Mutsokoti L, Palmers S, Vervoot L, Hendrickx M, Van Loey A. 2014. Comparing the impact of high pressure high temperature and thermal sterilization on the volatile fingerprint of onion, potato, pumpkin and red beet. *Food Res Int* 56: 218–225.

- Kevers C, Pincemail J, Tabart J, Defraigne J-O, Dommes J. 2011. Influence of Cultivar, Harvest Time, Storage Conditions, and Peeling on the Antioxidant Capacity and Phenolic and Ascorbic Acid Contents of Apples and Pears. *J Agric Food Chem* 59: 6165–6171.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. Review: Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18: 2328–2375.
- Klopotek Y, Otto K, Böhm V. 2005. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem* 51: 5640–5646.
- Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR. 2007. Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 55: 1612–1619.
- Kurz C, Carle R, Schieber A. 2008. HPLC-DAD-MSⁿ characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem* 110: 522–530.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem* 49: 4076–4082.
- Łata B, Trampczynska A, Paczesna J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scient Horticult* 121: 176–181.
- Latrasse A. 1991. Luku 4: Strawberries. Teoksessa: Maarse H, toim. *Volatile Compounds in Food and Beverages*. New York, Yhdysvallat: Marcel Dekker. s 333–340.
- Lee HS. 2004. Luku 19: Phenolic Compounds in Foods. Teoksessa: Nollet LML, toim. *Handbook of Food Analysis*. 3. painos. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s 717–746.
- Lesschaeve I, Langlois D, Etiévant P. 1991. Volatile Compounds in Strawberry Jam: Influence of Cooking on Volatiles. *J Food Sci* 56(5): 1393–1398.
- Lopes da Silva F, Escribano-Bailón MT, Alonso JJP, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT* 40: 374–382.
- Lubbers S, Guichard E. 2003. The effects of sugars and pectin on flavour release from a fruit pastille model system. *Food Chem* 81: 269–273.
- Lugasi A, Hovari J. 2002. Flavonoid aglycons in foods of plant origin. II. Fresh and dried fruits. *Acta Alimentaria* 31: 63–71.
- Maarse H, toim. 1977. *Volatile Compounds in Foods and Beverage*. New York, Yhdysvallat: Marcel Dekker.
- Mattila P, Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 50: 3660–3667.
- Mattila P, Hellström J, Törrönen R. 2006. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *J Agric Food Chem* 54: 7193–7199.
- Malmberg M. 2010. Elintarvikkeiden aineosien väärentäminen: marjatuotteiden aitouden osoittaminen antosyanikoostumuksen avulla. EKT-sarja 1471. Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos.
- Mazur SP, Nes A, Wold A-B, Remberg SF, Martinsen BK, Aaby K. 2014. Effects of ripeness and cultivar on chemical composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits and their suitability for jam production as a stable product at different storage temperatures. *Food Chem* 146: 412–422.

- Mir NA, Beaudry R. 1999. Effect of Superficial Scald Suppression by Diphenylamine Application on Volatile Evolution by Stored Cortland Apple Fruit. *J Agric Food Chem* 47: 7–11.
- Moore JC, Spink J ja Lipp M. 2012. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J Food Sci* 77(4): 118–126.
- Mueller T. 2012. *Extra Virginity: The Sublime and Scandalous World of Olive Oil*. Atlantic Books, Lontoo, Iso-Britannia. 256 s.
- Määttä-Riihinen KS, Kamal-Edin A, Törrönen AR. 2004. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *J Agric Food Chem* 52: 6178–6187.
- Okuda T, Yoshida T, Hatano T, Iwasaki M, Kubo M, Orime T, Yoshizaki M, Naruhashi N. 1992. Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochem* 31(9): 3091–3096.
- Paillard NMM. 1990. The Flavor of Apples, Pears and Quinces Teoksessa: Morton ID ja MacLeod AJ, toim. *Food Flavors. Part C: The Flavor of Fruits*. Amsterdam, Hollanti: Elsevier Science Publishers B.V. s 1–42.
- Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, Butler F. 2009. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov Food Sci Emerg Tech* 10: 308–313.
- Patras A, Brunton NP, Tiwari K, Butler F. 2011. Stability and Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Colour in Strawberry Jam during Storage. *Food Bioprocess Tech* 4: 1245–1252.
- Pedreschi R, Franck C, Lammertyn J, Erban A, Kopka J, Hertog M, Verlinden B, Nicolai. 2009. Metabolic profiling of ‘Conference’ pears under low oxygen stress. *Postharvest Biol Technol* 51: 123–130.
- Popken AM, Dechent HM, Gurster D. 1999. Investigations on the origin of carvone in orange juices as an off-flavour component. *Fruit Processing* 9: 338–341.
- Primrose S, Woolfe M, Rollinson S. 2010. Review: Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends Food Sci Tech* 21: 582–590.
- Puutarhatilastot. 2013. Tilastovakka-julkaisusarja 3/2014 MMM Tike, Maataloustilastot.
- Ranganna S. 1991. Proximate analysis, color measurement and sensory evaluation. Teoksessa: *Hand Book of Analysis and Quality Control of Fruits and Vegetable Products*. 2. painos. New Delhi, Intia: Tata McGraw Hill Co. Ltd. 1112 s.
- Ravid U, Elkabetz M, Zamir C, Cohen K, Larkov O, Aly R. 2009. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS–SPME stereoselective GC–MS. *Flavour Fragr J* 25: 20–27.
- Reid LM, O’Donnel CP, Downey G. 2004. Potential of SPME-GC and Chemometrics To Detect Adulteration of Soft Fruit Purees. *J Agric Food Chem* 52: 421–427.
- Riekkola, M-L ja Hyötyläinen, T. 2000. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. *Yliopistopaino, Helsinki*. 329 s.
- Riu-Aumatell M, Castellari M, López-Tamames E, Galassi S, Buxaderas S. 2004. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chem* 87: 627–637.
- Saevels S, Lammertyn J, Berna A, Veraverbeke EA, Di Natale C, Nicolai BM. 2004. Postharvest *Biol Technol* 31: 9–19.

- Salta J, Martins A, Santos RG, Neng NR, Nogueira JMF, Justino J, Rauter AP. 2010. Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. *J Funct Foods* 2: 153–157.
- Schieber A, Keller P, Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chrom A* 910: 265–273.
- Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I, Carle R. 2002. Detection of Isorhamnetin Glycosides in Extracts of Apples (*Malus domestica* cv. “Brettacher”) by HPLC-PDA and HPLC-APCIMS/MS. *Phytochem Anal* 13: 87–94.
- Schieber A, FÜgel R, Henke M, Carle R. 2005. Determination of the fruit content of strawberry fruit preparations by gravimetric quantification of hemicellulose. *Food Chem* 91: 365–371.
- Schieberle P, Hofmann T. 1997. Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixtures. *J Agric Food Chem* 45: 227–232.
- Schipilliti L, Dugo P, Bonaccorsi I, Mondello L. 2011. Headspace-solid phase microextraction coupled to gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometer and to enantioselective gas chromatography for strawberry flavoured food quality control. *J Chrom A* 1281: 7481–7486.
- Schuster B, Herrmann K. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochem* 24: 2761–2764.
- Schwieterman ML, Colquhoun TA, Jaworski EA, Bartoshuk LM, Gilbert JL, Tieman DM, Odabasi AZ, Moskowitz HR, Foltz KM, Klee HJ, Sims CA, Whitaker VM, Clark DG. 2014. Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, a Seasonal Influence, and Effects on Sensory Perception. *PLoS One* 9(2): 1–12.
- Seeram NP, Lee R, Scheuller S, Heber D. 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem* 97: 1–11.
- Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Mendes GC, Seabra RM, Ferreira MA. 2000. Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity. *Food Chem* 71: 281–285.
- Silva BM, Andrade PB, Martins RC, Seabra RM, Ferreira MA. 2006. Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. *Food Chem* 94: 504–512.
- Silva CL, Haesen N, Câmara JS. 2012. A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *J Chrom A* 1260: 154–163.
- Skupień K, Oszmiański J. 2004. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur Food Res Tech* 219: 66–70.
- Song J, Gardner BD, Holland JF, Beaudry RM. 1997. Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 45: 1801–1807.
- Tanrıöven D, Ekşi A. 2005. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chem* 93: 89–93.
- Tomás-Lorente F, García-Viguera C, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. 1992. Phenolic Compounds Analysis in the Determination of Fruit Jam Genuineness. *J Agric Food Chem* 40: 1800–1804.

- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. 2003. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* 51: 6347–6353.
- Urruty L, Giraudel J-L, Lek S, Roudeillac P, Montury M. 2002. Assessment of Strawberry Aroma through SPME/GC and ANN Methods. Classification and Discrimination of Varieties. *J Agric Food Chem* 50: 3129–3136.
- Vaclavik L, Shreiber A, Lacina O, Cajka T, Hajslova J. 2012. Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices. *Metabolomics* 8: 793–803.
- Van Leeuwen KA, Prenzler PD, Ryan D, Camin F. 2014. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 13: 814–837.
- Versari A, Biesebruch S, Barbanti D, Farnell PJ. 1997. Adulteration of Fruit Juices: Dihydrochalcones as Quality Markers for Apple Juice Identification. *Lebensm Wiss Technol* 30: 585–589.
- Vrhovsek U, Guella G, Gasperotti M, Pojer E, Zancato M, Mattivi F. 2012. Clarifying the Identity of the Main Ellagitannin in the Fruit of the Strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *J Agric Food Chem* 60: 2507–2516.
- Wang SY, Wei Z, Galletta GJ. 2002 Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J Agric Food Chem* 50: 6534–6542.
- Wang L-S, Stoner GD. 2008. Review: Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269: 281–290.
- Wang J, Kliks MM, Jun S, Jackson M, Li QX. 2010. Rapid Analysis of Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Honeys from Different Geographic Regions using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J Food Sci* 75(2): 208–214.
- Williams A, Ryan D, Olarte Guasca A, Marriott P, Pang E. 2005. Analysis of strawberry volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography with headspace solid-phase microextraction. *J Chrom B* 817: 97–107.
- Wu X, Prior RL. 2005. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J Agric Food Chem* 53: 2589–2599.
- Zabetakis I, Holden MA. 1997. Strawberry flavor: Analysis and Biosynthesis. *J Sci Food Agric* 74: 421–434.
- Zhang J, Wang X, Yu O, Tang J, Gu X, Wan X, Fang C. 2011. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *J Exp Bot* 62(3):1103–1118.
- Zhu X, Li S, Zhang Z, Li G, Su D, Liu F. 2010. Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *J Foods Eng* 101: 92–97.
- Zierler B, Siegmund B, Pfannhauser W. 2004. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 520: 3–11.

LIITE 1. Omenalajikkeiden aromiyhdisteitä. Menetelmissä käytetyt kuidut: DVB/CAR/PDMS = divinyylibentseeni-karbokseeni-polydimetyylisiloksaani, DVB/PDMS = divinyylibentseeni-polydimetyylisiloksaani, PDMS = polydimetyylisiloksaani.

Nimi	Lajike	Menetelmä (SPME-GC-MS, jos muuta ei mainita)	Lähteet
(E/Z)- α -farneseeni	Stark Delicious, Golden Delicious, Pinova, Granny Smith, Jonagold	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, 65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Song ym. 1997, Reid ym. 2004, Saevels ym. 2004, Aprea ym. 2011
1-butanoli		HRGC-MS	Elss ym. 2006
1-heksanoli		HRGC-MS	Elss ym. 2006
2-etyylifenoli	Pinova	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
2-heksenaali	Granny Smith	100 μ m PDMS	Reid ym. 2004
2-metyylibutanoli	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
2-metyylibutyyli-2-metyylibutanoaatti + heksyylipropanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
2-metyylibutyyliasetaatti	Jonagold, Golden Delicious	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Song ym. 1997, Saevels ym. 2004
2-metyylipropyliasetaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
2-metyylipropylibutanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
3-metyyli-1-pentanoli	Golden Delicious	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
4-metoksiallylibentseeni	Golden Delicious	100 μ m PDMS	Song ym. 1997
5-heksenyliasetaatti	Stark Deliciuos	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
6-metyyli-5-hepten-2-oni	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Butyyli-2-metyylibutanoaatti + metyyli-2-etyyliheksanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Butyyliasetaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS, HRGC-MS	Saevels ym. 2004, Elss ym. 2006
Butyylibutanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Butyyliheksanoaatti	Stark Deliciuos	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Butyyliheksanoaatti + heksyylibutanoaatti	Jonagold, Golden Delicious	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Song ym. 1997, Saevels ym. 2004
Butyylipentanoaatti + propyyliheksanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Butyylipropanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
E-2-heksenaali		HRGC-MS	Elss ym. 2006
E-2-heksenoli		HRGC-MS	Elss ym. 2006
Etyyli-2-metyylibutanoaatti	-	HRGC-MS	Elss ym. 2006
Etyylibutanoaatti	Stark Deliciuos	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Heksaanihappo	Granny Smith	100 μ m PDMS	Reid ym. 2004
Heksyli-2-metyylibutanoaatti	Pinova, Jonagold	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Song ym. 1997, Saevels ym. 2004, Aprea ym. 2011
Heksyliasetaatti	Jonagold, Golden Delicious	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Song ym. 1997, Saevels ym. 2004
Heksyliheksanoaatti + butyylikaproaatti	Jonagold, Golden Delicious	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS,	Song ym. 1997, Saevels ym. 2004
Isobutyyli-2-metyylibutanoaatti	Golden Delicious	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Isopentyliheksanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Metyyli-2-metyylibutanoaatti	-	HRGC-MS	Elss ym. 2006
n-butyylitiglaatti	Granny Smith	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
n-fenylianiliini	Granny Smith	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Pentyliasetaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Pentyliheksanoaatti + butyyliheptanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Propyyli-2-metyylibutanoaatti	Golden Delicious	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Propyyliasetaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Propyylibutanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Propyyliheksanoaatti	Stark Deliciuos	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS	Aprea ym. 2011
Propyylikaproaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS	Saevels ym. 2004
Propyylipropanoaatti	Jonagold	65 μ m DVB/PDMS, SPME-GC-MS	Saevels ym. 2004
γ -dekalaktoni	-	HRGC-MS	Elss ym. 2006

+ = yhdisteiden signaali piikit eivät erottuneet toisistaan

LIITE 2. Omenalajikkeiden fenolisia yhdisteitä.

Nimi	Molek. ioni [M-H] ⁻	Molek. ioni [M+H] ⁺	Aglyk. ioni [A+H] ⁺	Lajike	Menetelmä	Lähteet
Flavan-3-olit:						
(-)-epikatekiini	289	291		Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC/DAD, HPLC-ESI- MS/MS,	Andrade ym. 1998, Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005
(+)-katekiini	289	291		Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC/DAD, HPLC-ESI- MS/MS	Andrade ym. 1998, Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005
Prosyaniidiini B1	577	579	291	Goikoetxea Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC-ESI- MS/MS	Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004 Kahle ym. 2005
Prosyaniidiini B2	577	579	291	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC-ESI- MS/MS	Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004 Kahle ym. 2005
Prosyaniidiinitrimeeri	865	867	291	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Fenoliset hapot:						
4-p-kumaryylikiiniini- happo	337	339		Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC-ESI- MS/MS	Tsao ym. 2003, Kahle ym. 2005
Kahvihappo	179	181		Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji	HPLC-ESI- MS/MS	Kahle ym. 2005
Klorogeenihappo	353	355		Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC-ESI- MS/MS	Tsao ym. 2003, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009
Neoklorogeenihappo	353	355		Golden Delicious	HPLC/DAD	Andrade ym. 1998
Dihydrokalkonit:						
Floritsiini (floreitiini- 2'-O-β-D-glukosidi)	435	437	275	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC/DAD, HPLC-ESI- MS/MS	Andrade ym. 1998, Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009
Floreitiiniksylogluko- sidi (floreitiini-2'-O-β- D-(2"-O-ksylosyyli)- glukosidi)	567	569	275	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC/DAD, HPLC-ESI- MS/MS	Andrade ym. 1998, Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005
Hydroksifloreitiini- diglykosidi / 3- hydroksifloreitiini-2'- ksylosyyli-glukosidi	583	585	291	Goikoetxea, Empire, McIntosh, Cortland, Mutsu Red, Delicious, Northern Spy, Golden Delicious, Ida Red	HPLC/APCI-MS	Tsao ym. 2003, Alonso- Salces ym. 2004
Hydroksifloreitiini- monoglykosidi	451	453	291	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Flavonolit:						
Isoramnetiini-3- glukosidi	477	479	317	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Isoramnetiini-3-	623	625	317	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004

ramnoglukosidi						
Isoramnetiini glykosidi (tuntematon)	477	479	317	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Isoramnetiini glykosidi (tuntematon)	447	449	317	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Isoramnetiini glykosidi (tuntematon)	461	463	317	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Kversetiini	301	303	317	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji	HPLC/APCI-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Alonso-Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005
Kversetiini-3-arabinofuranosidi	433	435	303	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Kversetiini-3-arabinosidi	433	435	303	Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC-ESI-MS/MS	Schieber ym. 2001, Tsao ym. 2003, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009,
Kversetiini-3-galaktosidi	463	465	303	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji	HPLC/APCI-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Schieber ym. 2001, Tsao ym. 2003, Alonso-Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009
Kversetiini-3-glukosidi	463	465	303	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji	HPLC/APCI-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Schieber ym. 2001, Tsao ym. 2003, Alonso-Salces ym. 2004, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009
Kversetiini-3-ksylosidi	433	435	303	Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/DAD, HPLC-ESI-MS/MS	Andrade ym. 1998, Schieber ym. 2001, Tsao ym. 2003, Kahle ym. 2005, Cao ym. 2009
Kversetiini-3-ramnoglukosidi	609	611	303	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
Kversetiini-3-ramnosidi	447	449	303	Goikoetxea, Golden Delicious, Granny Smith, Red Delicious, Fuji, Ida Red	HPLC/APCI-MS, HPLC/DAD	Andrade ym. 1998, Schieber ym. 2001, Tsao ym. 2003, Alonso-Salces ym. 2004, Cao ym. 2009
Kversetiini-3-rutinosidi (rutiini)	609	611	303	Granny Smith, Golden Delicious, Red Delicious, Fuji	HPLC/DAD, HPLC-ESI-MS/MS	Andrade ym. 1998, Schieber ym. 2001, Kahle ym. 2005
Kversetiiniglykosidi (tunnistamaton)	433	435	303	Goikoetxea	HPLC/APCI-MS	Alonso-Salces ym. 2004
<i>Antosyaanit:</i>	[M-2H]⁻	[M]⁺	[A]⁺			
Peonidiini-3-galaktosidi	461	463	301	Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005
Syanidiini-3-arabinosidi	453	455	287	Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005
Syanidiini-3-galaktosidi	487	489	287	Goikoetxea, Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC/APCI-MS	Tsao ym. 2003, Alonso-Salces ym. 2004, Wu & Prior 2005
Syanidiini-3-glukosidi	447	449	287	Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005
Syanidiini-3-ksylosidi	417	419	287	Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005
Syanidiini-7-arabinosidi	417	419	287	Red Delicious, Fuji, Gala	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005

LIITE 3. Päärynälajikkeiden aromiyhdisteitä. Menetelmissä käytetyt kuidut: DVB/PDMS = divinyylibentseeni-polydimetyylisiloksaani, PDMS = polydimetyylisiloksaani.

Nimi	Lajike	Menetelmä (SPME-GC-MS)	Lähde
(E/Z)- α -farneseeni	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
1-heksanoli	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
2-furaanikarboksialdehydi	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
2-heksenyylasettaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
3-heksenyylasettaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
3-heksenyyliheksanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
6-metyyli-5-hepten-2-oli	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
6-metyyli-5-hepten-2-oni	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Amyylibentsoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Anetoli	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Butyyliasettaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Butyylibutanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Butyyliheksanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Dodekanoli	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
E-2-heksenaali	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
E-2-oktenaali	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Etikkahappo	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etikkahappo	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Etyyli-2,4-(E/E)-dekadienoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-2,4-(E/Z)-dekadienoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Etyyli-2,6-(Z/E)-dodekadienoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-2-dekenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-2-oktenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-3-hydroksidodekanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-4-dekenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyli-4-oktenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyylidekanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Etyylidodekanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyliheksanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Etyyliheksanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Etyylioktanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Etyylitradekanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Fenyylietyylialkoholi	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Fenyylietyyliasettaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Geranyyliasettaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Geranyylibutyaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Geranyyli-isobutyaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Heksanaali	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Heksyyliheksanoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Heksyyliasettaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Heksyylibutanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Heksyyli-isobutyaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Heptyyliasettaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Kanelialdehydi	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Limoneeni	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Linalooli	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Metyyli-2,4-(E/Z)-dekadienoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Metyyli-2,4-(Z/E)-dekadienoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Metyyli-2-dekenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Metyyli-4-dekenoaatti	-	100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Metyylidekanoaatti	Packham's Triumph	65 μ m DVB/PDMS, 100 μ m PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000

Metyylioktanoaatti	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS, 100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Metyylitetradekadienoaatti	-	100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
Nerolidoli	-	100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004
n-oktanol	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS, 100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Nonaanihappo	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Nonanaali	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Oktyylisetaatti	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS, 100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004, Chervin ym. 2000
Penttyylisetaatti	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
Undekatetraeni	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
α-kopaeeni	Packham's Triumph	65 µm DVB/PDMS	Chervin ym. 2000
β-damaskenoni	-	100 µm PDMS	Riu-Aumatell ym. 2004

LIITE 4. Päärynälajikkeiden fenolisia yhdisteitä.

Nimi	Molek. ioni [M-H] ⁻	Molek. ioni [M+H] ⁺	Aglyk. ioni [A+H] ⁺	Lajike	Menetelmä	Lähteet
(-)-epikatekiini	289	291		Rocha, Alexander Lucas, Anjou, Red Williams, Akca, Seker, Williams, Santa Maria, Starkrimson, Passa Crassane, Conference	HPLC/DAD, HPLC-MS / UV	Andrade ym. 1998, Schieber ym. 2001, Escarpa ja Gonzáles 2000, Tanrıöven ja Ekşi 2005, Salta ym. 2010
(+)-katekiini	289	291		Rocha, Conference	HPLC-DAD	Escarpa ja Gonzáles 2000, Salta ym. 2010
Arbutiini	271	273		Rocha, Alexander Lucas, Anjou, Red Williams, Conference	HPLC/DAD, HPLC-MS	Andrade ym. 1998, Escarpa ja Gonzáles 2000, Schieber ym. 2001, Salta ym. 2010
Ferulahappo	193	195		Rocha	HPLC-DAD	Salta ym. 2010
Gallushappo	169	171		Rocha	HPLC-DAD	Salta ym. 2010
Kahvihappo	179	181		Rocha, Akca, Seker, Williams, Santa Maria, Starkrimson, Passa Crassane	HPLC-DAD / UV	Salta ym. 2010, Tanrıöven ja Ekşi 2005
Klorogeenihappo	353	355		Rocha, Alexander Lucas, Anjou and Red Williams, Akca, Seker, Williams, Santa Maria, Starkrimson, Passa Crassane, Conference	HPLC-DAD / UV	Andrade ym. 1998, Escarpa ja Gonzáles 2000, Tanrıöven ja Ekşi 2005, Salta ym. 2010
Kumariinihappo	163	165		Rocha, Alexander Lucas, Anjou, Red Williams, Akca, Seker, Williams, Santa Maria, Starkrimson, Passa Crassane	HPLC-DAD / UV	Tanrıöven ja Ekşi 2005, Salta ym. 2010
Neoklorogeenihappo	353	355		Rocha	HPLC/DAD	Andrade ym. 1998
p-hydroksibentsoehappo	137	139		Rocha	HPLC/DAD	Andrade ym. 1998
Syreenihappo	197	199		Rocha	HPLC-DAD	Salta ym. 2010
Isoramnetiini-3-glukosidi	477	479	317	Alexander Lucas, Anjou, Red Williams	HPLC-MS	Schieber ym. 2001
Kversetiini-3-galaktosidi	463	465	303	Rocha, Alexander Lucas, Anjou, Red Williams	HPLC/DAD, HPLC-MS	Andrade ym. 1998, Schieber ym. 2001
Kversetiini-3-glukosidi	463	465	303	Alexander Lucas, Anjou, Red Williams	HPLC-MS	Schieber ym. 2001
Kversetiini-3-ramnosidi	447	449	303	Rocha	HPLC/DAD	Andrade ym. 1998
Kversetiini-3-rutinosidi (rutiini)	609	611	303	Alexander Lucas, Anjou, Red Williams	HPLC-MS	Schieber ym. 2001

LIITE 5. Kurpitsalajikkeiden aromi- ja fenoliyhdisteitä.

Prosessoidun kurpitsasoseen aromi- ja fenoliyhdisteitä.

Nimi	Lajike	Menetelmä	Lähteet
1,2,5,5-tetrametyyli-1,3-syklopentadieeni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,2,6-trimetyylisykloheksanoni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,2,6-trimetyylisykloheksanoni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,4,4-trimetyyli-2-sykloheksen-1-oli	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,4,4-trimetyyli-2-sykloheksen-1-oli	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,4-dimetyyli-1-hepteeni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,6,6-trimetyyli-1-syklohekseeni-1-asetaldehydi	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2,6,6-trimetyyli-1-syklohekseeni-1-asetaldehydi	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2-metyylibutanaali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
2-metyylipropanaali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
3,3,5-trimetyyli-1,5-sykloheksadieeni-1-karbaldehydi	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
3,4,4-trimetyyli-2-sykloheksen-1-oni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
3,5,5-trimetyyli-2-sykloheksen-1-oli	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
3-metyylibutanaali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
4-metyyliheptaani	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
4-metyyliheptaani	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
Heksanaali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
Nonanaali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
α -humuleeni	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
α -iononi	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
α -syklositraali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
β -iononi	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014
β -syklositraali	<i>Cucurbitaceae</i>	SPME-GC-MS	Kebede ym. 2014

Kurpitsan fenolisia yhdisteitä.

Nimi	Molek. ioni [M-H] ⁻	Molek. ioni [M+H] ⁺	Lajike	Menetelmä	Lähteet
Kahvihappo	179	181	<i>Cururbita pepo</i> , <i>maxima</i> , <i>moschata</i>	HPLC-DAD	Dragovic-Uzelac ym. 2005
Klorogeenihappo	353	355	<i>Cururbita pepo</i> , <i>maxima</i> , <i>moschata</i>	HPLC-DAD	Dragovic-Uzelac ym. 2005
Luteoliini	285	287	-		Lugasi ja Hovari 2002
p-kumariinihappo	163	165	<i>Cururbita</i> <i>moschata</i>	HPLC-DAD	Dragovic-Uzelac ym. 2005
Syreeninihappo	197	199	<i>Cururbita pepo</i> , <i>maxima</i> , <i>moschata</i>	HPLC-DAD	Dragovic-Uzelac ym. 2005

LIITE 6. Mansikkalajikkeiden aromiyhdisteitä.

Nimi	Menetelmä	Lähteet
(2E)-2-dekenaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2E)-2-heksen-1-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2E)-2-heksen-1-yylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2E)-2-oktenaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2E)-2-pentenaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2E)-metyyli-2-butanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2Z)-2-oktenaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2Z)-2-penten-1-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(2Z)-2-pentenaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(E)-2-heksenaali	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishébert ym. 2006
(E/Z)-3-heksenyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
(Z)-3-heksenoli	SPME-GC-MS	De Boishébert ym. 2006
(Z/E)-nerolidoli	SPME-GC-MS	De Boishébert ym. 2006
1-asettaatti-(2E)-2-heksen-1-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-asettaatti-2-metyyli-1-butanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-asettaatti-3-metyyli-1-butanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-asettaatti-3-metyyli-2-buten-1-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-asettaatti-4-(1-metyylietenyyli)-1-syklohekseni-1-metanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-heksanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-metyyliibutylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-metyylietylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-metyylietyliheksanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-pentanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-penten-3-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
1-penten-3-oni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2,3-heptaaniidioni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2,6-bis(1,1-dimetyylietyyli)-4-metyylifenoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-aminometyyliibentsoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-etyyli-1-heksanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-etyyliheksyliasetaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-heksanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-heptanoni	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishébert ym. 2006
2-hydroksimetyyliibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyyli-2-butanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyylibutaanihappo	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyyliibutyliasetaatti	-	Maarse 1977
2-metyylietyyli-2-butanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyylietylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyylinonyliipropanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-metyylioktyyliibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-nonanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
2-pentanoni	SPME-GC-MS	De Boishébert ym. 2006
3,7,11-trimetyyli-(6E)-1,6,10-dodecatrien-3-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3,7-dimetyyli-1,6-oktadien-3-oli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-etyylioktaani	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-heksanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-metyyliibutylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-metyylimetyyliibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-metyylioktyyliibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
3-pentanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
4-metyyli-2-pentanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
5-etenyylietrahidro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetyyli-, (2R,5S)-2-furaanimetanoli	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
5-heksyyliidihydro-2(3H)-furanone	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
6,6-dimetyyliisyklohept-2-ene-2-karboksaldehydi	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
6-metyyli-5-hepten-2-oni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Butaanihappo	-	Maarse 1977
Butyliasetaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishébert ym. 2006
Butylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014

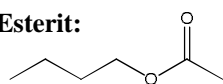
Dekylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Dihydro-5-oktyyli-2(3 <i>H</i>)-furanoni	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Etyyliasettaatti	-	Maarse 1977
Etylibutanoaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Etylidekanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Etyliheksanoaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Etylioktanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Etylipentanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Etylipropanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Eugenoli	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
Fenyyliimetyyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Furaneoli, DHF (2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3-[2H]-furanoni)	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Heksaanihappo	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
Heksanaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Heksyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Heksylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Heptanaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Isopropyliasettaatti	-	Maarse 1977
Isopropyliheksanoaatti	-	Maarse 1977
Limoneeni	-	Maarse 1977
Linanooli	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
Mesifuraani, DMF (2,5-dimetyyli-4-metoksi-3-[2H]-furanoni)	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Metyylianttraniilaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Metylibutanoaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Metyliheksanoaatti	GC-FID, SPME-GC-MS	Schwieterman ym. 2014, De Boishebert ym. 2006
Metylipentanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Nonanaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Oktaanihappo	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
Oktanaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Oktyyli-3-isovaleraatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Oktyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Oktylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Oktyliheksanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Pentanaali	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Pentyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Pentylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Propyyliasettaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Propyylibutanoaatti	GC-FID	Schwieterman ym. 2014
Trans-2-heksenaali	-	Maarse 1977
γ-dekalaktoni	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
γ-dodekalaktoni	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006
δ-dekalaktoni	SPME-GC-MS	De Boishebert ym. 2006

Schwieterman ym. (2014) työryhmän tutkimuksessa käytetyt lajikkeet: Camarosa, Festival, Mara des bois, Radiance, Sweet Charlie, Treasure, Winter dawn, Camino real, Winterstar, FI 05-85, Elyana, Red merlin, San andreas, Albion, Charlotte, Monterrey, Mojave, Chandler, FI 09-127, Rubygem, Darselect Sweet anne, Benicia, FI 06-38, Portola, Ventana, Evie 2, Galleta

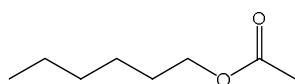
De Boishebert ym. (2006) työryhmän tutkimuksessa käytetyt lajikkeet: CF129, Ciflorette, Cigaline, Cilady, Ciloé, Cireine, Cigoulette, Earliglow, Pajaro, CF1116, Capitola, CF1693, CF2036, CF2559, Cifrance, Darselect, Madeleine, CF2337, CF 2302, CF 2537, Cal Giant 3, Naiad

LIITE 7. Mansikan aromiyhdisteiden rakenteita.

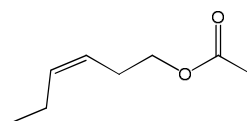
Esterit:



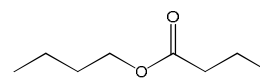
butyyliasetaatti



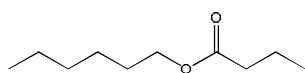
heksyyliasetaatti



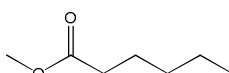
cis-3-heksenyliasetaatti



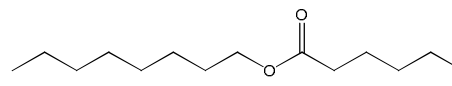
butyylibutanoaatti



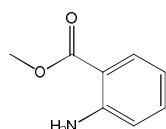
heksyylibutanoaatti



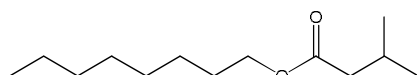
metyyliheksanoaatti



oktyyliheksanoaatti

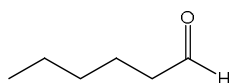


metyyli-antranilaatti

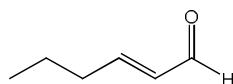


oktyyli-isovaleraatti (oktyyli-3-metyylibutanoaatti)

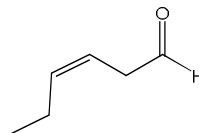
Aldehydit:



heksanaali

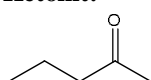


(E)-2-heksenaali

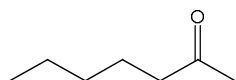


(Z)-3-heksenaali

Ketonit:

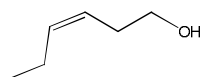


2-pentanoni

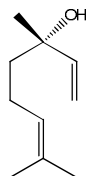


2-heptanoni

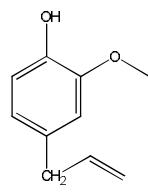
Alkoholit:



(Z)-3-heksenoli

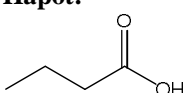


linalooli

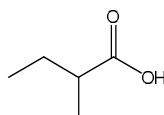


eugenoli

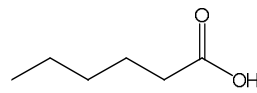
Hapot:



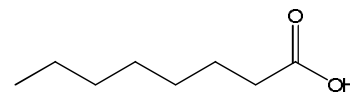
butaanihappo



2-metyylibutaanihappo

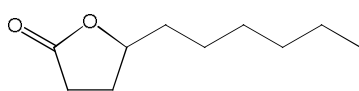


heksaanihappo

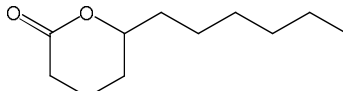


oktaanihappo

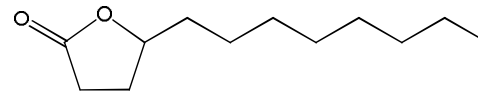
Laktonit:



γ -dekalaktoni

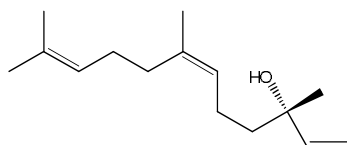


δ -dekalaktoni

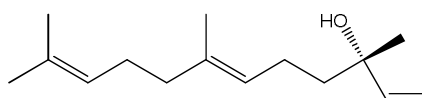


γ -dodekalaktoni

Terpeenit:



(Z)-nerolidoli



(E)-nerolidoli

LIITE 8. Mansikkalajikkeiden fenolisia yhdisteitä.

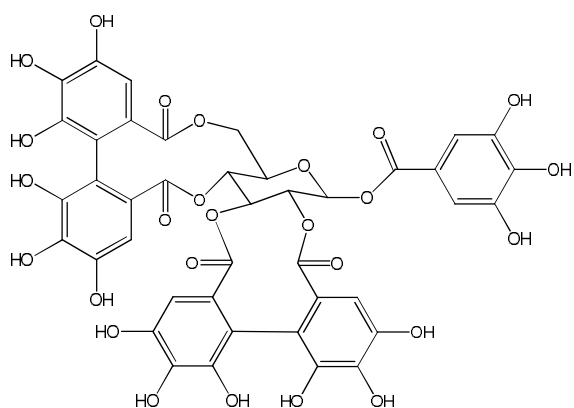
Nimi	Molek. ioni [M-H] ⁻	Molek. ioni [M+H] ⁺	Aglyk. ioni [A+H] ⁺	Lajike (muun muassa)	Menetelmä	Lähteet
Flavanolit:						
(+)-katekiini	289	291		*	HPLC-MS, LC-DAD	Aaby ym. 2012, Álvarez- Fernández ym. 2014
(+)-gallokatekiini	305	307			HPLC-UV	De Pascual-Teresa ym. 2000
(-)-epikatekiini	289	291		Jonsok	HPLC-UV, HPLC-DAD- MS	De Pascual-Teresa ym. 2000, Määttä-Riihinen ym. 2004
(-)-epikatekiini-3- <i>O</i> -gallaatti	441	443	291		HPLC-UV	De Pascual-Teresa ym. 2000
(-)-epigallokatekiini	305	307			HPLC-UV	De Pascual-Teresa ym. 2000
Prosyaniidiinidimeeri B1	577	579	291	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Prosyaniidiinidimeeri B2	577	579	291	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Prosyaniidiinidimeeri B3	577	579	291	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Prosyaniidiinitrimeeri EEC	865	867	291	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Fenoliset hapot:						
4-hydroksibentsoehappo	137	139		Bounty, Jonsok, Polka	HPLC- UV/DAD	Kähkönen ym. 2001, Mattila ym. 2006
4-hydroksibentsoehappo-4- <i>O</i> - glukosidi	299	301	139	Litessa	HPLC	Schuster ja Herrmann 1985
5- <i>O</i> -galloyylikiniinihappo	343	345	171	Litessa	HPLC	Schuster ja Herrmann 1985
Ellagihappo	301	303		Polka	HPLC-DAD- MS	Seeram ym. 2006, Mazur ym. 2014
Ellagihappoglukosidi	463	465	303	*	HPLC-MS	Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012
Gallushappo	169	171		Polka, Jonsok	HPLC-DAD	Mattila ym. 2006
Ferulahappo	193	195		Polka, Jonsok	HPLC-DAD	Mattila ym. 2006
Protokatekiinihappo	153	155		Polka, Jonsok	HPLC-DAD	Mattila ym. 2006
Vanilliinihappo	167	169		Polka, Jonsok	HPLC-DAD	Mattila ym. 2006
Kahvihappo	179	181		Polka, Jonsok	HPLC-DAD	Mattila ym. 2006
Neoklorogeenihappo	353	355			HPLC-DAD	Mattila ja Kumpulainen 2002
Kanelihappo	147	149		Polka, Jonsok, *	HPLC-DAD, HPLC-MS	Mattila ym. 2006, Aaby ym. 2012
p-kumariinihappo	163	165		Polka, Jonsok, Senga	HPLC-DAD- MS, HPLC- DAD	Määttä-Riihinen ym. 2004, Mattila ym. 2006, Aaby ym. 2007a
p-kumariinihappo-4- <i>O</i> - glukosidi	325	327	165	Jonsok	HPLC-DAD- MS	Määttä-Riihinen ym. 2004
p-kumaryyliglukoosi	325	327	165	**	HPLC-MS	Buendia ym. 2010
Kumaryyliheksaosi	325	327	165	*, Polka, Senga	HPLC-DAD- MS	Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Kinnamyyliglukoosi	309	311	149	*, Polka, Senga Sengana	HPLC-DAD- MS	Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Dihydrokalkonit:						
Floritsiini (floreitiini-2'- <i>O</i> -β-D- gluosidi)	435	437	275	Honeoye, Elsanta, Senga Sengana	HPLC-MS, NMR	Hilt ym. 2003
Flavanolit:						
Kampferoli-3-glukuronidi	461	463	287	*	HPLC-MS	Seeram ym. 2006, Aaby ym. 2012

Kampferoli-3-glukosidi	447	449	287	**	HPLC-MS, LC-DAD	Seeram ym. 2006, Buendia ym. 2010, Álvarez-Fernández ym. 2014
Kampferoli-3-(6-p-kumaryyli)-glukosidi	579	581	287	**, *	HPLC-MS	Seeram ym. 2006, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012
Kampferoli-3-malonyyilglukosidi	533	535	287	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Moriini	301	303			CE	Ehala ym. 2005
Kversetiini-3-glukuronidi	477	479	303	Jonsok, **, *	HPLC-DAD-MS, HPLC-MS	Määttä-Riihinen ym. 2004, Seeram ym. 2006, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012
Kversetiini-3-glukosidi	463	465	303		HPLC-MS	Seeram ym. 2006
Kversetiini-3-malonyyilglukosidi	549	551	303	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Kversetiini-3-rutinosidi (rutiini)	609	611	303		HPLC-MS	Seeram ym. 2006
Antosyaanit:	[M-2H]⁻	[M]⁺	[A]⁺			
Syanidiini-3-O-(6"-sukkinyyliglukosidi)	547	549	287	Allstar	HPLC-UV	Wang ym. 2002
Syanidiini-3-glukosidi	447	449	287	**, *, Polka, Senga Sengana	HPLC-DAD-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005, Lopes da Silva ym. 2007, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Syanidiini-3-rutinosidi	627	629	287		HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005
Syanidiini-3-malonyyilglukosidi	565	567	287	*	HPLC-MS	Aaby ym. 2012
Pelargonidiini-3-O-(6"-malonyyilglukosidi)	549	551	271	Polka	HPLC-DAD-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Pelargonidiini-3-O-(6"-sukkinyyliglukosidi)	531	533	271	Allstar, Jonsok	HPLC-DAD-MS	Wang ym. 2002, Määttä-Riihinen ym. 2004
Pelargonidiini-3-O-(6"-asetoyyliglukosidi)	473	475	271	*	HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005, Aaby ym. 2012
Pelargonidiini-3-arabinosidi			271	Senga Sengana	HPLC-UV	Skupien ja Oszmianski 2004
Pelargonidiini-3-glukosidi	431	433	271	Polka, *	HPLC-DAD-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005, Lopes da Silva ym. 2007, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Pelargonidiini-3-rutinosidi	611	613	271	Polka, *	HPLC-DAD-MS, HPLC-ESI-MS/MS	Wu & Prior 2005, Lopes da Silva ym. 2007, Buendia ym. 2010, Aaby ym. 2012, Mazur ym. 2014
Stilbeenit:	[M-H]⁻	[M+H]⁺				
Resveratrol	227	229			CE, LC-DAD	Ehala ym. 2005, Álvarez-Fernández ym. 2014
Ellagitanniini:						
Bis-HHDP-glukoosi	783	785		Senga Sengana	HPLC-DAD-MS	Aaby ym. 2007a
Bis-HHDP-galloyyliglukoosi	935	937		Jonsok, **	HPLC-DAD-MS, LC-DAD	Määttä-Riihinen ym. 2004, Seeram ym. 2006, Buendia ym. 2010, Álvarez-Fernández ym. 2014
Agrimoniini (bis-HHDP-galloyyliglukoosi dimeeri) mp. 1870	[M-2H] ²⁻ 935			Polka, *	HPLC-DAD-MS	Aaby ym. 2012, Vrhovsek ym. 2012, Gasperotti ym. 2013, Mazur ym. 2014
Sanguiniini H6 (bis-HHDP-galloyyliglukoosi dimeeri) mp. 1901	[M-2H] ²⁻ 935			**, Jonsok	HPLC-DAD-MS	Määttä-Riihinen ym. 2004, Seeram ym. 2006, Buendia ym. 2010
Lambertiini C (bis-HHDP-galloyyliglukoosi trimeeri) mp. 2834	[M-2H] ²⁻ 1401			**, Jonsok	HPLC-DAD-MS	Määttä-Riihinen ym. 2004, Buendia ym. 2010

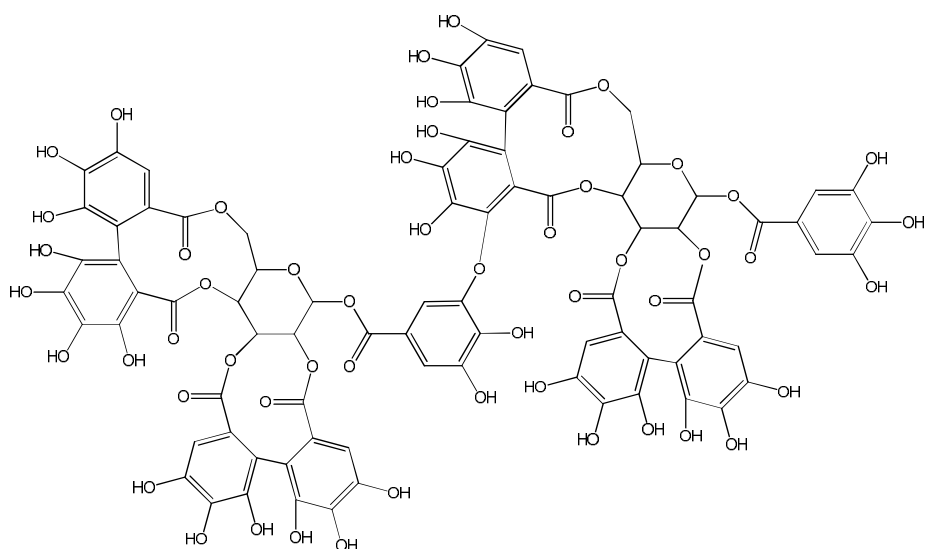
*) Aabyn ym. (2012) työryhmän tutkimuksissa käytetyt lajikkeet: Babette, Blink, Bounty, Carisma, Cifrance, Dania, Filon, Florence, Frida, Granda, Gudleif, Honeoye, Iris, Jonsok, Kent, Korona, Madeleine, Marlate, Nadine, Patty, Pegasus, Polka, Rondo, Rosie, Senga Sengana, Sonata, Zefyr

**) Buendian ym. (2010) työryhmän tutkimuksissa käytetyt lajikkeet: Aguedilla, Albió, Camarosa, Candonga, Carmela, Chiflón, Cisco, Coral, Festival, Galexia, Macarena, Marina, Medina, Rubygem, Ventana

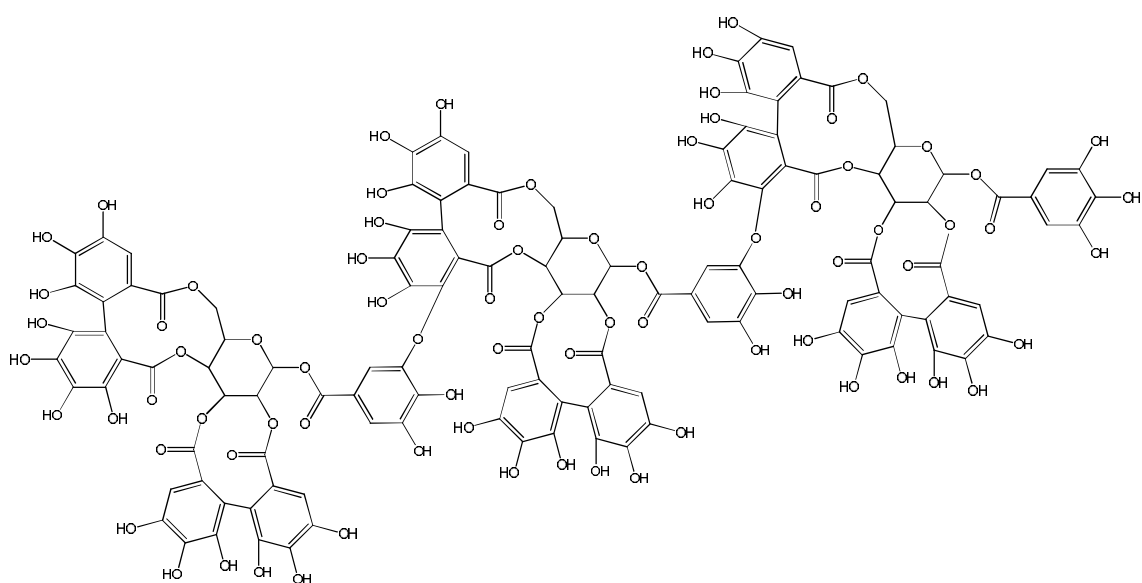
LIITE 9. Mansikan ellagitanniinien rakenteita.



bis-HHDP-galloyylglukoosi



sanguiniini H6



lambertianiini C

LIITE 10. Fenolisten yhdisteiden jaottelu pääryhmiin (mukailtu lähteistä Kammerer ym. 2012 ja Alarcon-Flores ym. 2014).

Ryhmä	Perusrakenne	Esimerkkejä
Yksinkertaiset fenolit	C ₆	Hydroksikinoni
Bentsokinonit	C ₆	Katekoli, resorsinoli
Fenoliset hapot	C ₆ -C ₁	
Hydroksibentsoehappo johdokset	C ₆ -C ₁	(p-hydroksi-)bentsoe-, gallus-, vanilliinihappo, prokatekiinihappo
Fenyylitikkahappo johdokset	C ₆ -C ₂	p-Hydroksifenyylasetaatti
Hydroksikanelihappo johdokset	C ₆ -C ₃	Ferula-, kaneli-, p-kumariini-, kahvi- ja klorogeenihappo
Kumariinit	C ₆ -C ₃	Eugenoli
Isokumariinit		Kumariini
Kromonit	C ₆ -C ₃	
Naftokinonit	C ₆ -C ₄	
Ksantonit	C ₆ -C ₁ -C ₆	Mangostiini
Stilbeenit	C ₆ -C ₂ -C ₆	trans-resveratrol
Flavonoidit	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Kalkonit		
Dihydrokalkonit		Floritsiini
Flavonit		Apigeniini, luteoliini, tangeriini
Flavonolit		Kversetiini, myrisetiini, rutiini, kampferoli
Dihydroflavonolit		
Flavanonit		Naringeniini
Flavanolit		Epigallokatekiini, epikatekiini, katekiini
Antosyaanit		Pelargonidiini, malvidiini, delfinidiini
Isoflavonoidit		Genisteiini
Lignaanit	(C ₆ -C ₃) ₂	Resinolit
Neolignaanit		
Ligniinit	(C ₆ -C ₃) _n	
Tanniiniset fenolit / flavonoidipolymeerit		
Kondensoituneet tanniinit	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _{3-n}	
Proantosyanidiinit		Prosyaniidiinit B1, B2, prodelfinidiinit
Hydrolysoituvat tanniinit		
Gallotanniinit		
Ellagitanniinit		Kasuariktiini
Dehydroellagitanniinit		

LIITE 11. Tutkimuksen kaupalliset näytteet (m = mansikka).

Tuote	Pakkaus- koko	Marjaa /100 g	Sokeria /100 g	Ainesosat	Parasta ennen	Huom.
Björnekulla m.luomuhillo	400 g	40	42	Mansikka, sokeri, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happo (sitruunahappo, trikalsiumsitraatti)	20.2.2015	
Kaskein Marja m.hillo	425 g	50	29	Mansikka 50 %, vesi, hedelmäsokeri 20 %, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	26.8.2016	
Ekströms vanhan ajan m.hillo	410 g	52	46	Mansikka, sokeri, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	21.6.2015	
St. Dalfour ranskalainen m.hillo	284 g	51	-	Mansikkaa 51 %, rypäle- ja taatelimehutiiviste, hyytelöimisaine (pektiini), sitruunamehu	16.10.2017	
Dronningholm m.hillo	440 g	35	47	Sokeri, mansikka, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	6.11.2015	
Saarioinen m.hillo	500 g	41	40	Mansikka, sokeri, vesi, sakeuttamisaineet (pektiini, ksantaanikumi), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	4.7.2015	
Saarioinen m.marmeladi	230 g	40	46	Mansikka, sokeri, vesi, hyytelöimisaineet (pektiini, johanneksenleipäpuujauhe), happam.säätöaine (sitruunahappo, kalsiumsitraatit), säilöntäaine (kaliumsorbaatti), aromi, värit (karmiinit, karotenoidit)	26.11.2015	
Meritalo suomalainen m.hillo	410 g	50	46	Mansikka, sokeri, vesi, sakeuttamis- ja hyytelöimisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (natriumbentoaatti, kaliumsorbaatti)	2.10.2015	Mansikoiden alkuperä: Suomi
Rainbow m.hillo	400 g	40	45	Mansikka, sokeri, vesi, hyytelöimisaineet (pektiini, ksantaanikumi), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	25.5.2016	Mansikoiden alkuperä: Puola ja Kiina
X-tra m.hillo	800 g	35	43	Mansikka, sokeri, vesi, glukoosi-fruktoosisiirappi, sakeuttamisaineet (pektiini, ksantaanikumi), happo (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti), rypälemehutiiviste	27.8.2015	Mansikoiden alkuperä: Puola
Pirkka m.hillo	400 g	35	47	Sokeri, mansikka, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	5.8.2015	
Euroshopper m.hillo	450 g	45	62	Glukoosi-fruktoosisiirappi, mansikka, sokeri, happo (sitruunahappo), hyytelöimisaine (pektiini)	1.1.2016	
Eldorado m.hillo	420 g	45	43	Mansikka, sokeri, glukoosi-fruktoosisiirappi, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaineet (natriumbentoaatti, kaliumsorbaatti)	20.11.2016	
Södergården m.hillo	1000 g	35	47	Sokeri, mansikka, vesi, sakeuttamisaine (pektiini), happam.säätöaine (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti)	24.10.2015	
Linessa kevyt m.levite	420 g	50	-	Osittain tiivistetty mansikka (50 %), fruktoosisiirappi, aroniatäysmehutiiviste, hyytelöimisaine (pektiini), happo (sitruunahappo), säilöntäaine (kaliumsorbaatti).	15.10.2015	
Maribel m.erikoishillo	450 g	50	60	Mansikka, sokeri, glukoosi-fruktoosisiirappi, hyytelöimisaine (pektiinit), happo (sitruunahappo)	29.5.2016	
Bonne premium m.sose	0,5 l	100	-	Mansikka 100 %	27.1.2016	

LIITE 12. Havaittuja ja alustavasti tunnistettuja mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan aromiyhdisteitä. M = mansikka, O = omena, P = päärynä, K = kurpitsa, Kaup = kaupalliset näytteet yhdistetysti (17 kpl). Tummennettu **X** = vain omenalle, päärynälle tai kurpitsalle tyypillinen yhdiste. (-) = yhdistettä ei havaittu näytteestä.

RT (min)	Yhdiste (alustava tunnistus)	M	O	P	K	Kaup
4,25-4,33	O: Heksanaali CAS 66-25-1, Kaup: Etyylibutanoaatti CAS 105-54-4	-	x	-	-	x
4,48-4,56	Butyyliasetaatti CAS 123-86-4, 2-metyylipropyliasetaatti CAS 110-19-0	-	x	x	-	x
4,95-4,99	Furfuraali CAS 98-01-1	-	-	-	-	x
5,18-5,25	M: 2-metyylibutaanihappo CAS 116-53-0, O: E-2-heksenaali CAS 6728-26-3	x	x	-	-	x
5,53	1-Heksanoli CAS 111-27-3, 4-metyylipentanolli CAS 626-89-1	x	x	-	x	x
5,68-5,72	2-metyylibutyliasetaatti CAS 624-41-9, isoamyliasetaatti CAS 123-92-2	-	x	-	-	x
5,89-5,92	2-heptanoni CAS 110-43-0	-	-	-	-	x
6,03	1,3-dihydroksi-2-propanoni CAS 96-26-4	-	-	-	-	x
6,36-6,37	Butyylipropionaatti CAS 590-01-2	-	x	-	-	-
6,51-6,56	Metyyliheksanoaatti CAS 106-70-7	x	-	-	-	x
7,06	Isobutyylibutanoaatti CAS 97-87-0	-	-	-	-	x
7,10-7,11	Z/E-2-Heptenaali CAS 57266-86-1 / 18829-55-5, Kaup: 1-Dodekanaali CAS 112-53-8	x	-	-	-	x
7,18-7,21	Bentsaldehydi CAS 100-52-7	x	-	-	-	x
7,38	Linaloylioksidi CAS 60047-17-8	-	-	-	-	x
7,51-7,59	Heksaanihappo CAS 142-62-1	x	-	-	-	x
7,62-7,63	O: 6-metyyli-5,2-heptenoni CAS 110-93-0, Kaup: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	x	-	-	x
7,69-7,72	<i>Tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	-	x
7,75-7,77	O: Butyylibutanoaatti CAS 109-21-7, Kaup: 2-metyylipropylipropanoatti CAS 97-85-8	-	x	-	-	x
7,83-7,84	Etyyliheksanoaatti CAS 123-66-0	x	-	-	-	x
7,95	(Z)-3-heksenyliasetaatti CAS 3681-71-8	-	-	-	-	x
8,04-8,07	Heksyliasetaatti CAS 142-92-7	-	x	x	-	x
8,12	Trans-2-heksenyliasetaatti CAS 2497-18-9, isosineoli CAS 470-67-7	-	-	-	-	x
8,24	Etyylibutenoli CAS 918-85-4	-	-	-	-	x
8,28	Näyte M: 1-metyyli-2-isopropylibentseeni CAS 527-84-4, Näyte C: pentylibutanoaatti CAS 540-18-1, Näyte K: p-symeeni CAS 99-87-6	-	-	-	-	x
8,33-8,36	Limoneeni CAS 5989-27-5 / 138-86-3	-	-	-	-	x
8,40	1,8-sineoli CAS 470-82-6	-	-	-	-	x
8,45-8,47	K: α-toluenoli CAS 100-51-6, Kaup: 1-dimetyylipropyliheksanoaatti CAS 116423-69-9, 1- metyylietyyliheksanoaatti CAS 2311-46-8	-	-	-	x	x
8,54-8,55	O: Butyyli-2-metyylibutanoaatti CAS 15706-73-7, Kaup: 2-heptanoliasetaatti CAS 5921-82-4	-	x	-	-	x
8,62	Propyylipentanoaatti CAS 141-06-0, propyyli-isovaleraatti CAS 557-00-6	-	-	-	-	x
8,66	α-linalooli CAS 598-07-2	-	-	-	-	x
8,77	Isoamylibutanoaatti CAS 106-27-4	-	-	-	-	x
8,85	Mesifuraani DMF (2,5-dimetyyli-4-metoksi-3(2H)-furanoni) CAS 4077-47-8	x	-	-	-	x
9,07	cis-linaloolioksidi CAS 5989-33-3	-	-	-	-	x
9,24	<i>Tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	-	x
9,34-9,37	Kaup: Kareeni CAS 554-61-0 / 29050-33-7, Näyte M: α-terpinoliini 586-62-9	-	-	-	-	x
9,49	M: β-linalooli 78-70-6, Näyte M: linalyyliformaatti CAS 115-99-1	x	-	-	-	x
9,57-9,61	Näyte F: Isopentyli-isovaleraatti CAS 659-70-1 Kaup: nonanaali CAS 124-19-6	-	-	-	-	x
9,84-9,88	Metyylioktanoaatti CAS 111-11-5, Näyte H ja E: Z-3-metyyli-2-penteeni CAS 922-62-3	-	-	-	-	x
10,01-10,05	2-etyyliheksaanihappo CAS 149-57-5	-	-	-	-	x
10,06	Näyte Q: trans-β-terpineoli CAS 138-87-4	-	-	-	-	x
10,11	E-3,2-nonenoni CAS 14309-57-0	x	-	-	-	x
10,09-10,19	2-etyyliheksaanihappo CAS 149-57-5	-	-	-	-	x
10,20	Näyte B: Karvomentoni CAS 5502-88-5	-	-	-	-	x
10,24-10,27	O: Heksyli-isobutanoaatti 2349-07-7, Näyte B: isobutyliheksanoaatti CAS 105-79-3, isopentyliheksanoaatti CAS 2198-61-0, Näyte M: 2- metyylipropyliheksanoaatti CAS 105-79-3	x	x	-	-	x
10,32-10,33	<i>Mahdollinen häiriöpiikki</i> / Näyte Q: osimenoli CAS 5986-38-9	x	x	x	x	x
10,42	<i>Mahdollinen häiriöpiikki</i> / Näyte A: furanoni CAS 5469-16-9	-	x	x	x	x

10,51	M: Bentsyyliasetaatti CAS 140-11-4, K: α -terpiini CAS 99-86-5, Näyte I ja E: p-etyylifenoli CAS 123-07-9	x	-	x	x	x
10,56-10,61	M: Etyyliibentsoaatti CAS 93-89-0, K: 1-nonanoli CAS 143-08-8, Näyte K, L ja G: oktaanihappo CAS 124-07-2	x	x	x	x	x
10,64-10,68	Dodekanaali CAS 112-54-9	-	-	x	-	x
10,67-10,76	Näyte H, B, A, O, F, I, E ja D: Oktaanihappo CAS 124-07-2	-	-	-	-	x
10,88-10,89	O, muut kaup: Heksyylibutanoaatti CAS 2639-63-6, Näyte I: heksyyli-isobutanoaatti CAS 2349-07-7	-	x	-	-	x
10,93-10,96	Näyte A, O ja I: Etyylioktanoaatti CAS 106-32-1, Muut kaup: α -terpineol CAS 98-55-5 / 470-08-6	-	-	-	-	x
11,00-11,03	Näyte K, H, B, O ja F: Metyyliisalisylaatti CAS 119-36-8	-	-	-	-	x
11,08-11,11	Dekanaali CAS 112-31-2	x	-	-	x	x
11,14-11,17	Oktyyliasetaatti CAS 112-14-1	-	-	-	-	x
11,17-11,20	2-heptylibutanoaatti CAS 39026-94-3	-	-	-	-	x
11,24-11,28	Kurpitsa: (E,E)-2,4-dekadienaali CAS 25152-84-5, Kaup: α -ioneni 475-03-6 tai jokin muu naftaleeni CAS 21693-51-6 / 30316-36-0 / 1078-04-2	-	-	-	x	x
11,30	Näyte N ja E: Etyyliibentsaldehydi CAS 53951-50-1	-	-	-	-	x
11,39-11,40	β -syklositraali CAS 432-25-7	-	-	-	x	x
11,44	Hydroksimetyylifurfuraali (HMF) CAS 67-47-0	-	-	-	-	x
11,52-11,55	O, Näyte C, P ja O: Heksyyli-2-metyyliibutanoaatti CAS 10032-15-2 Näyte A: 2-butyliasetaatti CAS 105-46-4	-	x	-	-	x
11,59-11,61	K: <i>tunnistamaton yhdiste</i> , Kaup: heksyyli-isovaleraatti CAS 10032-13-0	-	-	-	x	x
11,66	3-Metyyli-4-nonanoni CAS 35778-39-3	x	-	x	x	x
11,73	<i>Mahdollinen häiriöpiikki</i> / K: Karvoni CAS 99-49-0, Näyte A: Isopentyliheksanoaatti CAS 2198-61-0	x	-	x	x	x
11,82	M: trans-2-dekanaali CAS 3913-81-3, Näyte O: trans-geranioli CAS 106-24-1, Näyte G: 1,3-di-tert-butylbentseeni CAS 1014-60-4	x	-	x	-	x
11,87	Kaup: Neroli CAS 106-25-2	-	x	x	-	x
11,92	Näyte O: E-2-tridekanaali CAS 7069-41-2	-	-	-	-	x
11,97-12,06	Nonaanihappo CAS 112-05-0	x	-	x	x	x
12,17-12,20	Kurpitsa: furaaninyhdiste CAS 70424-14-5, Näyte J: 5-metyyli-5-propyyli-nonaani CAS 17312-75-3	-	-	-	x	x
12,27	Näyte M: Heptyyliheksanoaatti CAS 6976-72-3, pentyyliheksanoaatti CAS 540-07-8, Näyte K, Q ja D: β -osimeeni CAS 13877-91-3	-	-	-	-	x
12,36-12,37	2-Undekanoni CAS 112-12-9	-	-	-	-	x
12,38-12,42	α -ioneni 475-03-6 tai jokin muu naftaleeni CAS 21693-51-6 / 30316-36-0 / 1078-04-2	-	-	-	-	x
12,48-12,50	K: Tymoli CAS 89-83-8, Näyte M: α -terpineolin isomeeri CAS 10482-56-1 / 98-55-5 / 498-81-7	-	-	-	x	x
12,53-12,56	M: Undekanaali CAS 112-44-7, K: (2Z)-5,5-dimetyyli-2-hekseeni CAS 39761-61-0, Kaup: E-2-dekanaali CAS 3913-81-3, heksyyliasetaatti CAS 142-92-7	x	-	-	x	x
12,64	<i>Tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	-	x
12,69-12,70	M, P: E-2,4-nonadienaali CAS 5910-87-2, 2,4-dekadienaali CAS 25152-84-5, K: 1,E-4,Z-8-Dodekatrieeni CAS 83489-22-9	x	-	x	x	x
12,74-12,75	M: <i>tunnistamaton yhdiste</i> , K: 2-(2-Furyyli)-2-metyyli-3-butenaali CAS 31776-28-0, Näyte E: p-di-isopropylibentseeni CAS 100-18-5	x	-	-	x	x
12,76-12,79	Metyyliidekanoaatti CAS 110-42-9	-	-	-	-	x
12,90-12,91	P: Etyyli-2E,4E-heksadienoaatti CAS 5941-48-0, K: 2-furaanihappo CAS 88-14-2, Kaup: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	x	x	x
13,08	<i>Tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	x	x	x
13,24-13,28	1,1,6-trimetyyli-1,2-dihydronaftaleeni CAS 30364-38-6	-	-	-	-	x
13,33	E-2-oktenaali CAS 2548-87-0	x	-	x	-	x
13,50-13,53	Butyylibutanoaatti CAS 109-21-7	x	-	-	-	x
13,57-13,59	M, O: Heksyyliheksanoaatti CAS 6378-65-0	x	x	x	-	x
13,63-13,64	Oktyyliibutanoaatti CAS 110-39-4, Näyte F: metyylikinnamaatti CAS 103-26-4	-	-	-	-	x
13,66-13,67	Trans- β -damaskenoni CAS 23726-93-4	x	x	x	-	x
13,72-13,73	P: Etyyli-2E,4Z-nonadienoaatti CAS 4493-42-9, metyyli-2E,4Z-dekadienoaatti CAS 108965-84-0, Näyte A: etyyliidekanoaatti CAS 110-38-3	-	-	x	-	x
13,75-13,77	<i>Mahdollinen häiriöpiikki</i> / O: tetradekaani CAS 629-59-4	x	x	x	x	x
13,81-13,83	<i>Mahdollinen häiriöpiikki</i> / Näyte O: isobutyliheksanoaatti CAS 105-79-3	x	x	x	x	x
13,85-13,86	Näyte H, A, O: 1-metyylioktyyliibutanoaatti CAS 69727-42-0	-	-	-	-	x

13,90	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / Näyte M: 1-Undekanoli CAS 112-42-5</i>	x	-	x	x	x
14,06-14,07	β -hydroksietyylibentsoaatti CAS 94-33-7, isobutylibentsoaatti CAS 94-46-2	x	x	x	x	x
14,18-14,22	P: <i>tunnistamaton yhdiste</i> , K: α -iononi CAS 127-41-3 / 6901-97-9, Näyte K, A, O ja C: n-oktyyli-2-metylibutanoaatti CAS 29811-50-5	-	-	x	x	x
14,45-14,48	Trans-geranyliasetonin CAS 3796-70-1	x	x	x	x	x
14,49-14,53	(Z)- β -farneseeni CAS 28973-97-9	x	-	-	-	x
14,63-14,64	Etyyli-(E2,Z4)-dekadienoaatti CAS 3025-30-7, Kaup: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	x	x		x
14,68-14,74	Etyylikinnamaatti CAS 103-36-6 / 4192-77-2, γ -Dekalaktonin CAS 706-14-9	x	-	-	-	x
14,73	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / tunnistamaton yhdiste</i>	x	x	x	x	x
14,96	K: β -Ionone CAS 14901-07-6 / 79-77-6, P, Kaup: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-		x	x	x
14,99-15,02	O: (Z,E)- α -farneseeni CAS 26560-14-5, bergamoteeni CAS 13474-59-4, M, P, K, Kaup: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	x	x	x	x	x
15,12	Naftaleeni-yhdiste CAS 515-17-3	-	-	-	-	x
15,14-15,17	M, Kaup: α -muuroleeni CAS 31983-22-9, O, P: E,E- α -farneseeni CAS 502-61-4	x	x	x	-	x
15,18-15,21	<i>Tunnistamaton naftaleeniyhdiste</i>	x	-	-	-	x
15,30-15,33	Näyte G: trans- γ -bisaboloni CAS 53585-13-0	-	-	-	-	x
15,43-15,45	<i>Tunnistamaton yhdiste</i>	x	-	-	-	x
15,57	K: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	X	-
15,59-15,63	α -bisaboloni CAS 17627-44-0, bergamotoli CAS 88034-74-6, β -osimeeni CAS 13877-91-3	-	-	-	-	x
15,78	Dodekaanihappo CAS 143-07-7	-	-	-	-	x
15,83-15,87	M: E-nerolidoli CAS 7212-44-4 / CAS 40716-66-3, O, P: <i>tunnistamaton yhdiste</i>	x	x	x	-	x
16,04	Amyyliheksanoaatti CAS 540-07-8, heksyyliheksanoaatti CAS 6378-65-0	-	-	-	-	x
16,23	O: Nonadekaani CAS 629-92-5, Näyte Q: dokosaani CAS 629-97-0	-	x	-	-	x
16,26-16,27	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / tunnistamaton yhdiste</i>	x	-	x	x	x
16,39-16,40	5,8-dimetyylidodekaani CAS 90600-89-8, heksadekaani CAS 544-76-3	-	-	x		x
16,54	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / propyylidodekanoaatti CAS 3681-78-5</i>	-	-	x	x	x
16,86	4-etyyli-4-metyyli-1-hekseeni CAS 90674-67-2	-	-	X	-	-
16,97	2-etyyli-1-dodekanaali CAS 19780-33-7	-	-	X	-	-
17,01-17,02	Bisabololioksidi B CAS 55399-12-7, bisabololioksidi A CAS 22567-36-8	x	-	-	-	x
17,20-17,23	γ -dodekalaktonin CAS 2305-05-7, γ -undekalaktonin CAS 104-67-6, γ -nonalaktonin CAS 104-61-0	x	-	-	-	x
17,29-17,32	3-pentadekanonin CAS 18787-66-1 / <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	x	-	x
17,36	2,6,10-trimetyylidodekaani (farnesaani) CAS 3891-98-3	-	-	-	-	x
17,98-18,02	Näyte E: dekaanihappo CAS 334-48-5 / <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	-	x
18,22	Dekyylioktanoaatti CAS 2306-89-0 / <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	X	-
18,68-18,71	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / propyylietradekanoaatti CAS 14303-70-9</i>	x	-	x	x	x
18,90	Näyte A: geranyliasetaatti CAS 105-87-3 / <i>tunnistamaton yhdiste</i>	-	-	-	-	x
19,28-19,29	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / 1-heptadekanoli CAS 1454-85-9</i>	-	-	-	x	x
20,03-20,08	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / heksadekaanihappo CAS 57-10-3</i>	-	-	-	-	x
20,50-20,53	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / oktadekyyliasetaatti CAS 822-23-1</i>	-	-	-	-	x
20,68	<i>Mahdollinen häiriöpiikki / propyyliheksadekanoaatti CAS 2239-78-3</i>	x	x	x	x	x

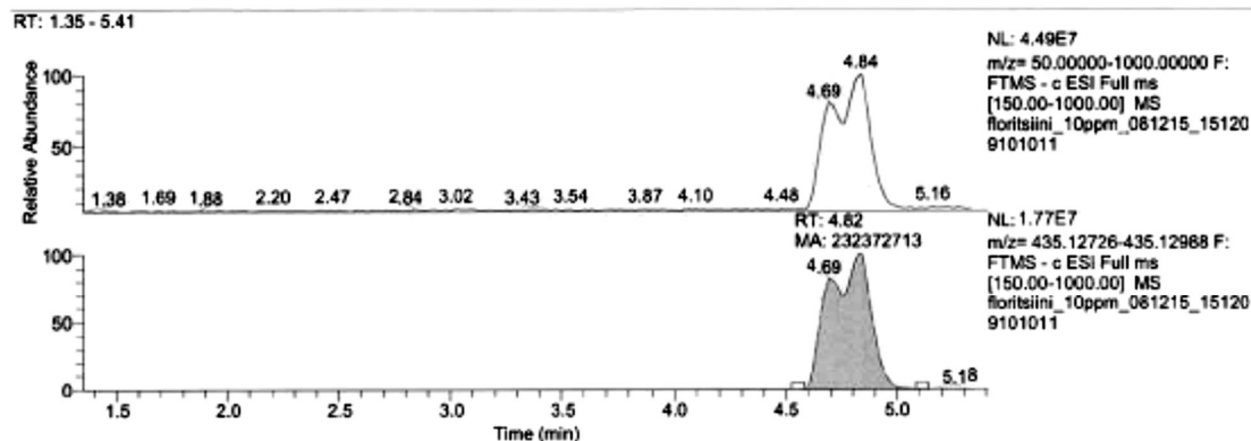
LIITE 13. Havaittuja ja alustavasti tunnistettuja mansikan, omenan, päärynän ja kurpitsan fenolisia yhdisteitä. M = mansikka, O = omena, P = päärynä, K = kurpitsa, Kaup = kaupalliset näytteet yhdistetysti (17 kpl). Vahvimpana esiintyneet MS²- ja MS³-ionit tummennettu. (-) = yhdistettä ei havaittu näytteestä.

RT (min)	MS (m/z)	MS ²	MS ³	MW	Yhdiste (alustava tunnistus)	Viite	M	O	P	K	Kaup
5,53-5,67	[M-H] ⁻ 567	273	167	568	Floretiiniksylosyyli-glukosidi	Kahle ym. 2005	x	x	x	-	x
6,17-6,21	[M-H] ⁻ 435	273	167	436	Floritsiini	Hilt ym. 2003, Kahle ym. 2005 + malliaine	x	x	-	-	x
2,59-2,70	[M-H] ⁻ 577	451 425 407	407	578	Proantosyanidiini B3 / B2	Aaby ym. 2007a / 2012	x	x	-	-	x
2,87-2,93	[M-H] ⁻ 577	451 425 407	407	578	Proantosyanidiini B3 / B2	Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
3,16-3,23	[M-H] ⁻ 289	289 245 205	245 227 203	290	(+)-katekiini	Aaby ym. 2007a	x	x	-	-	x
3,75-3,80	[M-H] ⁻ 289	289 245 205	245 227 203	290	(+)-katekiini	Aaby ym. 2007a	x	x	-	-	x
3,31-3,49	[M-H] ⁻ 325	265 187 163 145	119	326	p-kumaryyliheksososi	Aaby ym. 2007a	x	x	x	-	x
3,58-3,66	[M-H] ⁻ 325	265 187 163 145	119	326	p-kumaryyliheksososi	Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
3,44-3,54	[M-2H] ⁻ 431	269	269 241 225 147	433	Pelargonidiini-3-glukosidi	Jianghao ym. 2012	x	-	-	-	x
3,87-4,04	[M-H] ⁻ 431	385	223 205 161 153		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	x	x	x	x
4,56-4,60	[M-H] ⁻ 431	385	223 205 161 153		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
3,89-3,97	[M-2H+H ₂ O] ⁻ 449	355 329 287 269	193	433	Pelargonidiini-3-glukosidi (H ₂ O-addukti)	Jianghao ym. 2012	x	x	-	-	x
4,15-4,21	[M-H] ⁻ 433	433 301	301 257	434	Ellagihappopentosidi / kversetiini-3-ksylosidi tai kversetiini-3-arabinosidi	Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
4,22-4,30	[M-2H] ⁻ 473	269	269 241 225 147	475	Pelargonidiini-3-(6"-asetyyli)glukosidi)	Aaby ym. 2012	x	-	-	-	x
3,04-3,12	[M-H] ⁻ 447	285	285 257 241 217	448	Kampferoli-3-glukosidi	Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
3,70-3,74	[M-2H] ⁻ 447	401	287, 269	449	Syanidiini-3-glukosidi	Aaby ym. 2007a, Jianghao ym. 2012	x	-	-	-	x
4,32-4,40	[M-H] ⁻ 447	447 301	301	448	Ellagihappodeoksi-heksosidi / kversetiini-3-ramnosidi / isoramnetiiniglykosidi	Schieber ym. 2002, Kahle ym. 2005, Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
5,43-5,52	[M-H] ⁻ 447	447 301	301	448	Ellagihappodeoksi-heksosidi / kversetiini-3-ramnosidi / isoramnetiiniglykosidi	Aaby ym. 2007a	x	x	-	-	x
4,64-4,72	[M-H] ⁻ 301	301 257 229	-	302	Ellagihappo	Seeram ym. 2006, Aaby ym. 2007a	x	-	-	-	x
5,72-5,77	[M-H] ⁻ 301	151 , 179	-	302	Kversetiini (kversetiinin johdannaisen pilkkoumasta)	Kahle ym. 2005, Aaby ym. 2007a	x	x	-	x	x
4,90-4,95	[M-H] ⁻ 477	301	301 179 151	478	Kversetiini-3-glukuronidi / isoramnetiini-3-glukosidi	Schieber ym. 2002, Aaby ym. 2007a / 2012	x	-	-	-	x
5,40-5,45	[M-H] ⁻ 357	237	167		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	x	-	-	x

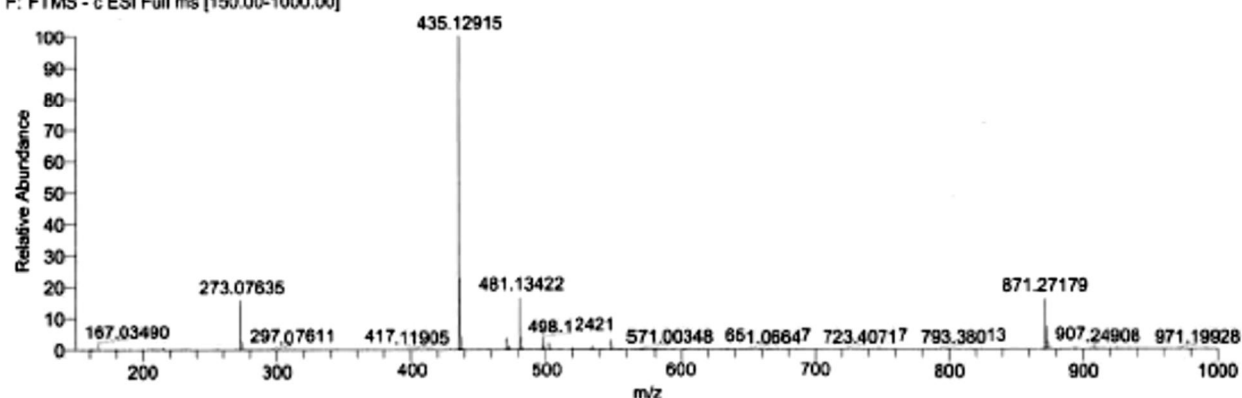
6,96-7,02	[M-H] ⁻ 357	219 195	219 201 175 145		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	-	x
5,72-5,78	[M-H] ⁻ 609	301	301 286 242	610	Kversetiini-3-rutinosidi (rutiini)	Seeram ym. 2006	x	x	-	x	x
5,84-5,89	[M-H] ⁻ 609	301	301 286 242	610	Kversetiini-3-rutinosidi (rutiini)	Seeram ym. 2006	x	-	x	-	x
6,37-6,44	[M-H] ⁻ 371	281 251 209	251 207 167 125		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	-	x
7,87-7,89	[M-H] ⁻ 371	233 209	233 215 175 149		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	-	x
3,14-3,18	[M-H] ⁻ 353	191	173 127 93 85	354	Klorogeenihappo	Kahle ym. 2005	x	x	x	-	x
3,77-3,80	[M-H] ⁻ 353	191	173 127 93 85	354	Klorogeenihappo	Kahle ym. 2005	-	x	-	-	x
3,97-4,01	[M-H] ⁻ 337	191 173	155 111 93 71	338	4-p-kumaryylikininihappo	Kahle ym. 2005	-	x	-	-	-
4,17-4,22	[M-H] ⁻ 351	351 333 249	231 175 113		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	x	-	-	x
5,44-5,47	[M-H] ⁻ 245	245 203	159 116	246	(+)-katekiinin pilkkoumasta	Aaby ym. 2007a	-	x	-	-	x
4,07-4,13	[M-H] ⁻ 259	215	171 169 116 92		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
4,32-4,36	[M-H] ⁻ 259	215	171 169 116 92		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
5,51-5,58	[M-H] ⁻ 607	299	284		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
6,39-6,47	[M-H] ⁻ 199	171 155	143 127		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
8,47-8,54	[M-H] ⁻ 327	327	327 291 229		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		x	-	-	x	x
9,11-9,17	[M-H] ⁻ 329	329	329 311 229	330	Ferulaattihappoheksoosi johdannaisen pilkkoumasta	Aaby ym. 2007a	x	x	-	x	x
2,60-2,63	[M-H] ⁻ 783	301 481	301	784	Bis-HHDP-glukoosi	Aaby ym. 2007a	-	-	-	-	x
2,94-2,97	[M-H] ⁻ 633	301 463	301	634	HHDP-galloyyliglukoosi	Aaby ym. 2007a	-	-	-	-	x
3,47-3,49	[M-H] ⁻ 463	301	301 179 151	464	Kversetiini-3-glukosidi	Seeram 2006, Aaby ym. 2007a, Jianghao ym. 2012	-	-	-	-	x
3,47	[M-H] ⁻ 639	463, 301, 257, 229			Gallotanniini / ellagitanniini	Seeram ym. 2006	-	-	-	-	x
3,60	[M-H] ⁻ 469	?	?		<i>Mahdollisesti hajonnut osa galloyyli-diHHDP-glukoosia</i>	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
3,91-3,93	[M-H] ⁻ 461	415	269		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
3,95	[M-H] ⁻ 935	633 301	301	933	Galloyyli-diHHDP-glukoosi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
4,29	[M-H] ⁻ 491	447	429 357 327		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
5,19-5,24	[M+HCO ₂] ⁻ 487	441	293 147	442	Kinnamyliksylosyyli-glukoosi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
5,33-5,34	[M-H] ⁻ 303	183 165	137 121		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
5,46-5,47	[M-H] ⁻ 447	447 285	285 267 257	448	Kampferoli-3-glukosidi	Aaby ym. 2007a	-	-	-	-	x
5,47-5,49	[M-H] ⁻ 461	315 285	285 257	462	Kampferoli-3-glukuronidi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
5,68-5,70	[M+HCO ₂] ⁻ 355	309 207 147	147	310	Kinnamyyliglukoosi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
5,87-5,89	[M-HCO ₂] ⁻ 489	489 285	285 267 257 241 229	534	Kampferoli-3-malonyyliglukosidi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
6,37-6,39	[M-H] ⁻ 711	?	?		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x

6,74	[M-H] ⁻	463	417	255 179 161		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
6,77- 6,80	[M-H] ⁻	711	665 503	485 459 441		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
7,05- 7,09	[M-H] ⁻	593	593 447 285	285	594	Kampferoli-3- kumaryyli-glukosidi	Aaby ym. 2012	-	-	-	-	x
7,28	[M-H] ⁻	307	307 263	233		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
7,83- 7,87	[M-H] ⁻	385	223	223 179		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x
8,08- 8,10	[M-H] ⁻	695	649 487	469 425 407	696	Hajonnut osa prosyaniidiinin trimeeriä	Aaby ym. 2007a	-	-	-	-	x
9,15- 9,20	[M-H] ⁻	385	247 223	247		<i>Tunnistamaton yhdiste</i>		-	-	-	-	x

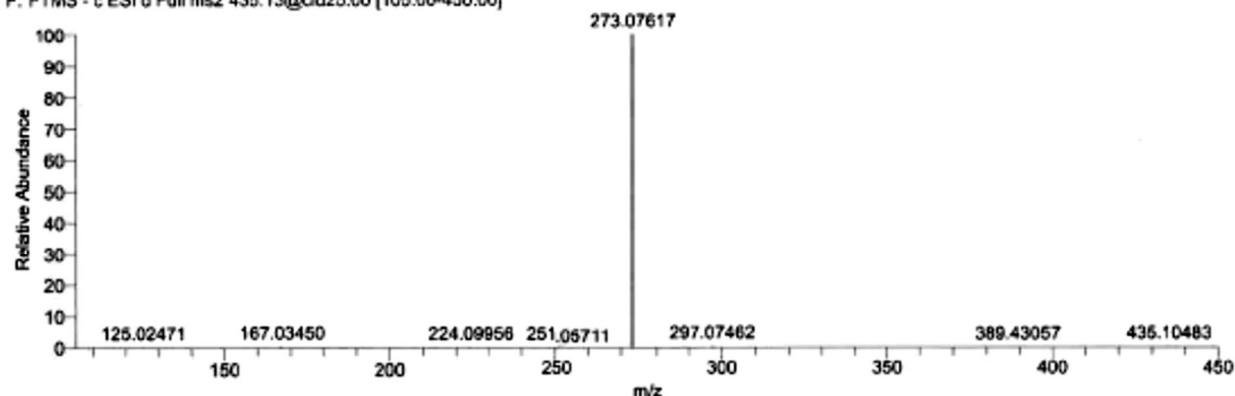
LIITE 14. Floritsiinin malliaineen massaspektri.



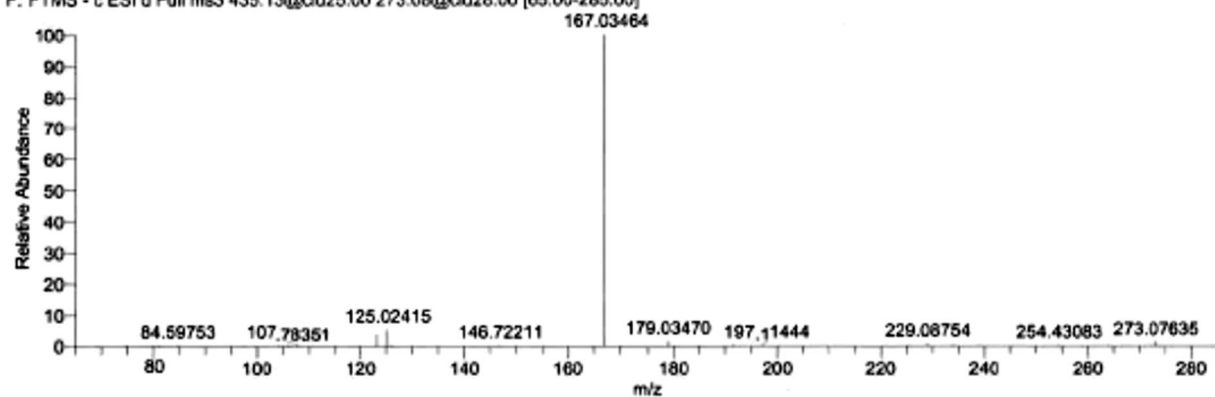
floritsiini_10ppm_081215_151209101011 #823 RT: 4.82 AV: 1 NL: 1.77E7
F: FTMS - c ESI Full ms [150.00-1000.00]



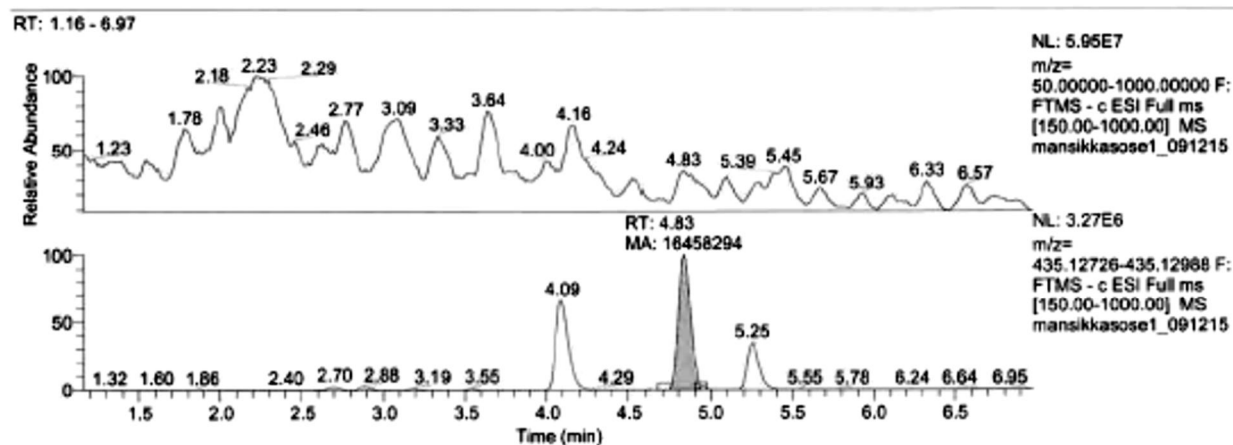
floritsiini_10ppm_081215_151209101011 #821 RT: 4.82 AV: 1 NL: 5.11E6
F: FTMS - c ESI d Full ms2 435.13@cid25.00 [105.00-450.00]



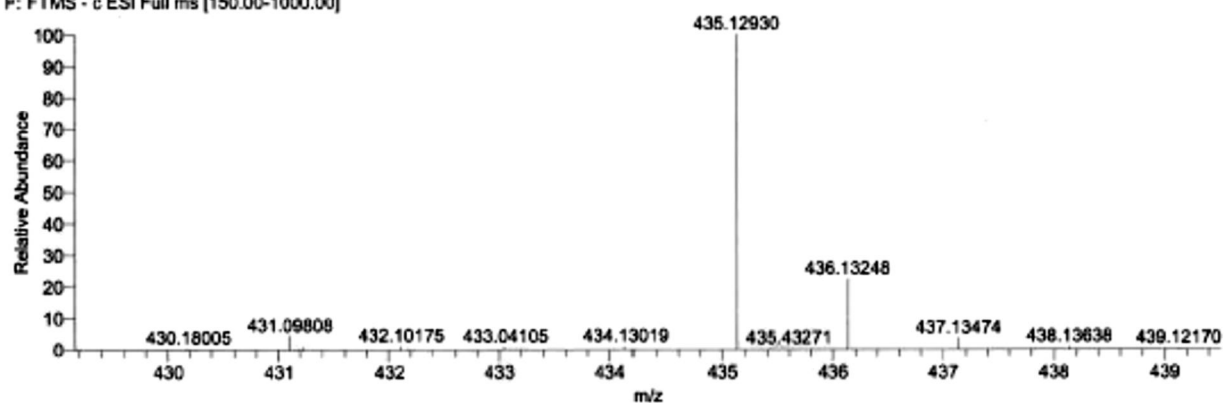
floritsiini_10ppm_081215_151209101011 #822 RT: 4.82 AV: 1 NL: 1.89E6
F: FTMS - c ESI d Full ms3 435.13@cid25.00 273.08@cid28.00 [65.00-285.00]



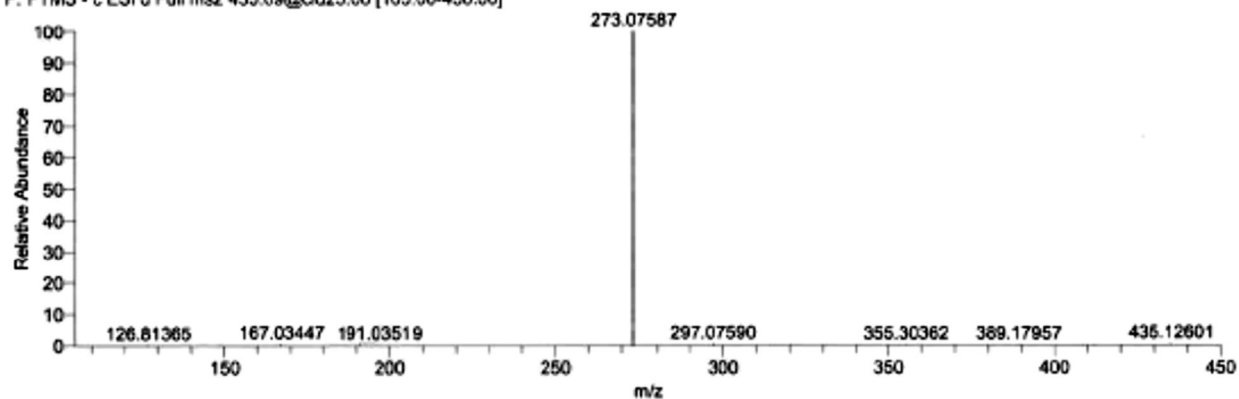
LIITE 15. Polka-mansikkalajikkeesta tehdyn soseen massaspektri floritsiinin havaitsemisesta.



mansikkasose1_091215 #973 RT: 4.83 AV: 1 NL: 3.27E6
F: FTMS - c ESI Full ms [150.00-1000.00]



mansikkasose1_091215 #971 RT: 4.83 AV: 1 NL: 7.70E5
F: FTMS - c ESI d Full ms2 435.08@cid25.00 [105.00-450.00]



mansikkasose1_091215 #972 RT: 4.83 AV: 1 NL: 2.81E5
F: FTMS - c ESI d Full ms3 435.13@cid25.00 273.08@cid26.00 [65.00-285.00]

